

キ ャ ウ リ モ ザ イ ク ウ イ ル ス の 葉 組 織 内
増 殖 機 構 に 関 す る 研 究

農 学 専 攻 (植 物 病 理 学)

長 谷 修

目 次

I	緒 論	- - - - 1
II	既 往 の 研 究	- - - - 7
III	材 料 お よ び 方 法	- - - 2 2
1 .	供 試 ウ イ ル ス と 供 試 植 物	- - - 2 2
2 .	ウ イ ル ス の 精 製	- - - 2 3
3 .	ウ イ ル ス R N A の 抽 出	- - - 2 5
4 .	C M V - 0 R N A 2 の ク ロ ー ニ ン グ	- - - 2 6
5 .	塩 基 配 列 の 決 定 法	- - - 3 5
6 .	植 物 組 織 か ら の t o t a l R N A の 抽 出	- 3 9
7 .	R N A ブ ロ ッ ト 分 析	- - - 4 0
8 .	外 被 タ ン パ ク 質 の 定 量 法	- - - 4 2
IV	結 果	- - - 4 4
1 .	C M V - 0 の ゲ ノ ム 構 造	- - - 4 4
1 . 1	C M V - 0 R N A 2 の ク ロ ー ニ ン グ と シ ー ケ ン ス	- - - 4 4
1 . 2	C M V - 0 R N A 2 と 他 の ク ク モ ウ イ ル ス 群 の R N A 2 の 比 較	- - - 5 1
1 . 3	考 察	- - - 5 3
2 .	C M V 接 種 タ バ コ 葉 組 織 に お け る ウ イ ル ス	

増 殖 の 解 析	- - - 5 9
2 . 1 病 徴	- - - 5 9
2 . 2 一 次 感 染 組 織 に お け る ウ イ ル ス ゲ ノ ム の 合 成	- - - 6 0
2 . 3 リ ー フ デ ス ク に お け る 感 染 初 期 の ウ イ ル ス ゲ ノ ム の 合 成	- - - 6 7
2 . 4 接 種 葉 と 接 種 リ ー フ デ ィ ス ク で の ウ イ ル ス ゲ ノ ム 合 成	- - - 7 1
2 . 5 ウ イ ル ス 活 性 と ウ イ ル ス 外 被 タ ン パ ク 質 の 増 加	- - - 7 4
2 . 6 考 察	- - - 7 7
3 . C M V 接 種 サ サ ゲ 葉 組 織 に お け る ウ イ ル ス 増 殖 の 解 析	- - - 8 4
3 . 1 C M V - L 接 種 サ サ ゲ の 場 合	- - - 8 4
3 . 1 . 1 病 徴	- - - 8 4
3 . 1 . 2 接 種 葉 組 織 で の ウ イ ル ス ゲ ノ ム 合 成	- - - 8 5
3 . 1 . 3 ウ イ ル ス 全 R N A と ウ イ ル ス 外 被 タ ン パ ク 質 の 合 成	- - - 8 8
3 . 1 . 4 考 察	- - - 8 9

3.2	CMV-Y接種ササゲの場合	- - - 93
3.2.1	病徴およびウイルス外被タンパク質 の合成	- - - 93
3.2.2	ウイルスゲノムの合成	- - - 95
3.2.3	考察	- - - 97
3.3	全身感染と局部感染におけるウイルス ゲノム合成の比較	- - 101
3.3.1	CMV各系統のウイルス活性検定	101
3.3.2	ウイルス全RNAの合成	- - 102
3.3.3	考察	- - 103
V	総合考察	- - 109
VI	摘要	- - 117
VII	引用文献	- - 123

I 緒 論

植物ウイルスは、傷や虫媒等によって宿主植物に侵入すると、そこで宿主の代謝系を利用して増殖する。宿主はウイルスの感染・増殖に伴い生理代謝に変動が生じ、生育異常や、極端な場合は壊死することもある。ウイルスの感染・増殖の機構は、ウイルス病の病理を研究する上で重要であり、Tobacco mosaic virus (TMV) 等を中心に研究が進んできた。

TMVは一本鎖RNAゲノム型のウイルスで、宿主細胞に侵入すると、まず外被タンパク質(CP)がゲノムから解離するいわゆる脱外被が行われる。TMVなどのゲノムはmRNAとして働き、細胞中のリボゾームを取り込み、初期タンパク質を合成する。初期タンパク質は、宿主由来のタンパク質も加わりウイルス核酸複製酵素を形成し、ウイルスゲノムが複製される。続いて新生したCPとウイルスゲノムが集合して子ウイルス粒子が形成される。ウイルス粒子

の生成と平行して、そのゲノムにコードされている細胞間移行タンパク質の発現によって、隣接した細胞へ移行し、次々に細胞が感染して行く。このようなウイルス増殖機構はプラス鎖の一本鎖RNAゲノムを持つウイルスに共通している。

一方、ウイルスの感染・増殖に伴い、宿主細胞はさまざまな生理変動をきたし、多くの場合病徴が発現する。この生理変動はウイルスと宿主の組み合わせによって、全身感染や局部感染といった感染のタイプの決定にも関係する。全身感染の場合、ウイルスは宿主細胞に侵入後増殖と周辺細胞への移行を繰り返しながら移管束に入り、植物個体全域に広範囲に拡大していくと考えられている。これに伴って多くの場合はモザイク、黄化、萎縮などの病徴が発現する。一方、局部感染の場合、ウイルスは侵入した細胞およびその隣接細胞で増殖するが、それ以上の多くの細胞へは広がらない。また、これらの感染細胞が急激に

致死的な生理異常を引き起こすことによって壊死斑を形成し、それに伴ってウイルスのさらなる移行増殖が阻止される場合もある。このような宿主組織の急激な死は、過敏反応と呼ばれている。例えばTMVはN遺伝子を保有するタバコにおいて過敏反応を誘導し壊死斑が形成されるが、それに伴って感染特異的タンパク質 (pathogenesis related protein, PR protein) が生成されるなど (Van Loon & Van Kammen, 1970)、生理変動について多くの研究が進められている。また、N'遺伝子を保有するタバコへのTMV感染による壊死斑の形成は、ウイルスのCPと宿主のN'遺伝子の相互作用によることが知られている (Saito, et al., 1987)。このような宿主の反応は主として組織の段階で起きている場合が多く、宿主組織の反応に伴うウイルス増殖機構を解析することは重要である。

Cucumber mosaic virus (CMV) は peanut stunt virus (PSV) や tomato aspermy virus

(T A V) と共に ククモウイルスグループに属し、極めて宿主範囲が広く、TMV と並び農学上重要な病原ウイルスである。CMV は三粒子分節RNA ゲノム型のウイルスであり、感染増殖に必須の遺伝情報が分節して存在している。この点で一分節ゲノム型のTMV と全く異なっている。したがってCMV の場合分節ゲノムであることが、感染増殖の過程でどんな意義を持つのか興味をもたれる。

CMV には植物に対する反応性の違いなどから多くの分離株が同定されている。その中で普通系統 (CMV - O)、黄斑系統 (CMV - Y) 並びにマメ科系統 (CMV - L) 等ほとんどの系統は、タバコに対して全身感染する。一方、ササゲ (品種、黒種三尺) に対してCMV - L は全身感染するが、CMV - O, Y はササゲの過敏感反応による壊死斑形成によって局部感染する。このようにCMV はその系統と宿主の組み合わせによって、全身感染と過敏感反応による局部感染など異なった感染型が認められる。過敏感反応の発現機構

については未だ明らかにされていない。また、宿主内でCMVのような文節ゲノムの各セグメントがどのように組織中で増殖しているかについても明らかではない。

本研究ではCMV感染タバコおよびササゲにおける全身感染におけるウイルスゲノム各セグメントの増殖を組織レベルで解析し、ササゲの過敏反応におけるそれらの相違を明らかにすることを目的とした。これらの研究を始めるに当たり、供試ウイルスCMV-0についてこれまで明らかにされていなかったゲノムRNA 2の塩基配列を決定し、供試ウイルスゲノムの全塩基配列を知るとともに相互比較を行った。

本研究を行うにあたり、東北大学農学部植物病理学講座教授 江原淑夫博士には終始懇切なる御指導と本論文の御校閲を賜りました。同助教授 羽柴輝良博士にも終始懇切なる御指導戴きました。また、同助手高橋英樹博士、同助手柄澤明氏、同技官鈴木寿夫氏、同技官伊東久美子女史には有意義な御助言を戴きました。さらに吉川正信博士をはじめ大学院生、学生諸氏には御協力を戴きました。また三菱化成 早川孝彦博士には貴重なプローブを分譲して戴きました。ここに、以上の皆様に心から感謝の意を表します。

II 既往の研究

植物ウイルスの発見は、1892年に Iwanowski がタバコのモザイク病の病原が細菌濾過器を通過する濾過性病原体であることをつきとめたことに基ずいている。やがて、1935年に Stanley が初めてタバコモザイクウイルスをタンパク質の結晶体として単離しその実態が明らかにされた。これ以来多くのウイルスが分離同定され、ウイルス病の研究が飛躍的発展を遂げることとなった。

ウイルス病の研究は主として病原ウイルス側からの研究と感染宿主側からの研究に分けられる。ウイルス側の研究はウイルスの構造および構成する核酸やタンパク質の機能の解明を主体とし、宿主側としてはウイルスの細胞内感染・増殖とそれに伴う細胞の生理変動を明らかにすることであった。

Cucumber mosaic virus (CMV) は Doolittle (1916) と Jagger (1916) によってキュウリのモ

ザイク病の病原としてはじめて報告されて以来、世界各地で多くの分離系統が同定されてきた。CMVはPeanut stunt virus (PSV)やTomato aspermy virus (TAV)と共にククモウイルスグループに属し、極めて宿主範囲が広く、これまでわかっているだけでも85科775種に感染する(Kaper & Waterworth, 1981; Palukaitis, et al., 1992)。それぞれの系統は、血清学的手法、核酸のハイブリダイゼーション、ならびに外被タンパク質(CP)のペプチドマッピングから、さらに2つのサブグループ(I, II)に分類されている(Palukaitis, et al., 1992)。

CMVの構造は三粒子分節RNAゲノム型の球状粒子であり、通常ウイルス粒子からは4分子のRNAが抽出される。これらは分子量の大きい方からRNA 1, 2, 3, 4と名付けられ、そのうちRNA 1, 2, 3が感染に必須である(Peden & Symons, 1973)。また、それぞれのRNAに対応して1a, 2a, 3aと呼ばれるタンパク質と外被タ

ンパク質 (CP) が翻訳されることが、 *in vitro* translation より示されている (Schwinghamer & Symons, 1977)。近年、遺伝子工学の発達により多くのウイルス核酸の塩基配列が決定され、CMV についてもサブグループ I に属す CMV-Y, CMV-Fny と、サブグループ II に属する CMV-Q について全ゲノムの塩基配列がすでに決定され、構造の解析が進むとともに機能が推測されている (Rezaian, *et al.*, 1984, 1985; Davies & Symons, 1988; Nitta, *et al.*, 1988a; Kataoka, *et al.*, 1990a, b; Rizzo, & Palukaitis, 1988, 1989; Owen, *et al.*, 1990)。

CMV の RNA 1 は約 3.3 Kbp、RNA 2 は約 3.0 Kbp からなり、それぞれには 1a と 2a タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が確認されている。1a と 2a は共にウイルスの複製に関与する RNA 依存 RNA ポリメラーゼ因子の一つと考えられており、1a はヘリカーゼ活性ドメインを、2a はポリメラーゼドメインを

含んでいることが解ってきた (Gorbalenya & Koonin, 1989; Habili & Symons, 1989)。プロトプラストにおいては、RNA 1と2のみの接種でそれらの複製が可能であることが報告されている (Nitta, et al., 1988b)。また、複製に関与する宿主由来の成分として 50 kDa のタンパク質が単離されている (Hayes & Buck, 1990)。RNA 3 は 2.2 Kbp から成り、2つの ORF が存在する。5'側の ORF は 3a タンパク質を、3'側の ORF は CP をコードしており、3a タンパク質は TMV, bromo mosaic virus (BMV) および alfalfa mosaic virus (AlMV) などの 30K や 3a タンパク質との比較から細胞間移行に関与していると考えられている。RNA 4 は 1.1 Kbp から成る RNA 3 の 3'側に相同なサブゲノム RNA で、CP はこれより翻訳される (Schwinghamer & Symons, 1977)。

CMV の各ゲノムやその翻訳産物の機能は、以上のほかにも病徴、宿主範囲、感染のタイプ、虫媒伝播性などのさまざまな性質にも関与することが遺伝学的な研究から明らかにされて

いる。例えば、各ゲノムを相互に組み換えたシュウドリコンビナントウイルスの感染性を調べることにより、トウモロコシへの感染にはRNA 2が支配するという報告がある(Rao & Francki, 1982)。CMVのマメ科植物への全身感染には、RNA 2が関与していると報告されている(Hanada & Tochiwara, 1980; Edwards, *et al.*, 1983)。アブラムシ伝播性にはRNA 3が関与している(Mossop and Francki, 1977)。また、全ゲノムの遺伝情報を相互に比較することにより塩基レベルないしはアミノ酸レベルでの違いが限定され、系統間にみられるさまざまな性質を導くウイルスゲノムの因子が推測されている(Shintaku, 1991)。さらには、各系統のゲノムの1塩基ないし一部の領域を交換したリコンビナントウイルス転写物を用いた実験から、CMVよるタバコへの激しいモザイクの発現には、CPの129番目のアミノ酸が支配している例も報告されている(Shintaku, *et al.*, 1992)。このようにウイルスゲノムの情

報が次々に明らかになると共に機能の解明も進んでいる。

一方、ウイルスが植物に侵入後ウイルスゲノムやその翻訳産物がどのような過程を経て発現しているのかを明らかにすることは、ウイルス増殖機構を解明する上で重要である。さらには、それに伴う宿主反応との関係の機構を知る手がかりとなる。そのために組織ならびにプロトプラストへの感染系が用いられてきた。

プラス鎖RNAゲノム型ウイルスの複製過程については、一般には、ウイルスが細胞に侵入し脱外被すると、ウイルスがコードする複製に関与する初期タンパク質と宿主由来のタンパク質によって、プラス鎖を鋳型としてマイナス鎖が合成される。それが二本鎖の状態にある複製型(RF)、次いで複製中間体(RI)を経てプラス鎖が合成される。そしてCPとゲノムRNAが集合して粒子が構成されると考えられている。最もよく研究されているTMVの場合、そ

の感染葉中からゲノムとサブゲノムのと思われる4つのdsRNAが検出されている(Zelcer, et al., 1981; Palukaitis, et al., 1983; Sulzinski, et al., 1985)。また、TMVではゲノムがmRNAとして働き、タンパク質が80sリボゾーム上で合成される(Sakai & Takebe, 1970)。

ウイルス成分の合成の経時変化については、当初プロトプラストの系を用いて調べられてきた。アクチノマイシンD処理と紫外線照射によって宿主のRNA合成を阻害したTMV感染タバコプロトプラストにおいて、RF, RIおよび複製酵素関連の140kタンパク質の合成量が感染初期の段階で活発になり、ゲノムRNAおよびCPのmRNAは感染初期に発現するがそれらに比べ緩やかに合成され、CPやウイルス粒子は4-6時間遅れて緩やかに増加することが示されている(Sakai & Takebe, 1974; Ogawa & Sakai, 1984)。また、TMVのプラス鎖およびマイナス鎖のcDNAをプローブとしたハイブリダイゼー

ション法によってより詳細に検討することが可能になり、マイナス鎖に比べプラス鎖の合成量が多いことが示された (Watanabe & Okada, 1986)。

葉組織におけるウイルス増殖過程は細胞間移行や組織間移行の要素が加わることで組織で個々の細胞が感染する時間が同一でないために感染における同調性を欠く。Dawson *et al.* (1975) は、低温下でTMVを接種し同調的に感染させることを試みその後適温に戻すと、接種葉組織においても、プロトプラストにおける同調的な感染による一段増殖がみられることを報告した。さらに、この同調的な系でウイルスRNAの合成を調べたところ、プロトプラスト系と同じように、6-8時間後にssRNAないしdsRNAの合成が始まることが示された (Dawson & Schlegel, 1976)。

組織にみられる細胞間のウイルス移行に関する研究は当初、表皮剥離法によってその移行速度を測定することが多く、タバコにおけ

る TMV は、表皮から葉肉へ 27℃ で 4 時間 (Fry & Matthews, 1963)、*N. glutinosa* においては 20℃ で 10 時間といった報告がある。やがて、30℃ 以下ではトマト接種葉において移行増殖できるが、30℃ 以上にすると細胞間移行しない TMV-L の ミュータント ウイルスの TMV-Ls1 が分離され (Nisiguchi, et al., 1978)、塩基配列を解析した結果から TMV-L の 30K タンパク質の 1 アミノ酸が置換した ミュータント である事が示された (Ohno, et al., 1983)。さらに、TMV の 30K タンパク質を発現する形質転換タバコにおいて、TMV-Ls1 は 30℃ 以上で全身に感染可能になったことから、30K タンパク質が移行タンパク質であることが決定づけられた (Doem, et al., 1987)。30K ならびにそのサブゲノム mRNA 合成の経時変動については、タバコプロトプラストにおいて、ウイルス RNA や CP mRNA は逐次合成されるのに対し初期に一時的にしか合成されないことが知られていた (Watanabe, et al., 1984)。その後、接種葉

組織でも30Kタンパク質は他のウイルス関連タンパクの合成に比べ感染後早い段階で合成が最大になり、30Kタンパク質の合成には異なる調節機構が働いていると考えられた。さらに、接種葉ではその後も合成が長く続くという報告もある(Joshi, et al., 1983; Lehto, et al., 1990)。

ウイルスと宿主の組み合わせによっては宿主細胞が過敏反応してウイルスの移行を抑制する場合があり、過敏反応系には全身感染系とは異なる増殖機構が働いていると考えられる。TMVに対する過敏反応は、*N. glutinosa*由来の単一優性遺伝子であるN遺伝子(Holmes, 1938)や、*N. sylvestris*由来のN'遺伝子(Valleau & Johnson, 1943)によって引き起こされ、接種葉に壊死斑が形成される。

壊死斑形成とウイルス増殖過程については、N遺伝子を含むプロトプラストにおいては壊死は起こらずウイルスが増殖することから、過敏反応は組織のレベルで起きると考えられ

ている (Otsuki, et al., 1972)。また、N 遺伝子を含むタバコ葉に TMV を接種した場合、30℃以下では壊死斑が形成されるが、その後 30℃以上にすると壊死斑部のウイルスが移行増殖し、再び 22℃に戻すと拡大した壊死斑が形成されることが報告されている (本吉, 1988)。

壊死斑形成は、ウイルスが増殖しつつある感染細胞群およびその周辺細胞との相互作用によって生じると考えられる。しかしウイルスゲノムおよびそれから発現するタンパク質合成が、壊死斑の誘導にどのように関わっているのかについては不明である。

壊死斑形成に伴う宿主の代謝変動については、pathogenesis-related protein (PR タンパク質) を初めとする種々の物質の生成が TMV 感染系を中心に報告されている。最近では、PR タンパク質の誘導物質としてサリチル酸が注目されており、また、これがウイルスの増殖を抑えるという報告もある (Malamy, et al., 1991; Yalpani, et al., 1991; Ohashi, 1986)。

一方、CMVの細胞内増殖過程については、これまでの研究と、他の植物ウイルスや動物ウイルスでの研究に共通したデータを基に推測されている段階で、細部に於いてはまだまだ不明な点が多い (Palukaitis, et al., 1992)。現在知られている例としては、アクチノマイシンD処理と紫外線照射したCMV接種タバコプロトプラストにおいてRI, RFが検出されている。また、ウイルスゲノムは接種後6時間目より合成され18時間後にピークを迎えそれ以降減少すること、そしてRNA 3の合成が、他のゲノムセグメントの合成に比べ高いことを報告している (Takanami, et al., 1977)。CMV RNAのcDNAをプローブとしたハイブリダイゼーションによって、よりintactなササゲプロトプラスト系でのウイルスRNAを検出した例では、ウイルスRNAは接種後50時間まで増加し、CPはウイルスゲノムとほとんど同じように合成される (Gonda & Symons, 1979)。

組織におけるウイルス増殖については、あ

まり研究は進んでいないが、病徴の部位とウイルスの蓄積に関していくつか報告されている。CMV感染により生じたタバコのモザイク葉において、緑色部に比べ黄色部にウイルスが多く存在し、細胞の中でクリスタル配列をしているのが観察されている(Ehara & Misawa, 1974)。また、dsRNAを検出した結果、緑色部には、dsRNA 3とdsRNA 4が比較的多く存在し、病徴の部位によってウイルス成分の蓄積量が異なることが報告されている(Ohki, et al., 1990)。しかしウイルスが蓄積されるまでの増殖の経緯については不明である。

一方、CMV感染による宿主の生理・生化学的変動については研究が進んでおり、接種葉タバコにおける黄色斑の発現に伴い、poly(A)-mRNA合成とポリゾーム量、次いで宿主タンパク質量とリボゾーム量の低下が認められている(Takahashi & Ehara, 1988)。さらに、タンパク質の2次元電気泳動の解析から23kDaと24kDaのポリペプチドの低下が認められ、それら

は光化学系II酸素発生系複合体を形成するポリペプチドであることが示され、それらの低下が酸素発生活性の低下を引き起こしていると推測されている (Takahashi, et al., 1991; Takahashi & Ehara, 1992)。

CMVに対するササゲの過敏反応による壊死斑形成については、壊死斑形成前に接種葉から接種表皮組織細胞を剥離すると、表皮細胞は壊死しないことから、壊死斑形成は組織のレベルで感染細胞群の相互作用によって引き起こされると考えられている (Ehara & Misawa, 1968)。壊死斑形成とウイルス増殖に関する研究では、ウイルスの移行と壊死斑形成に及ぼす温度の影響について、接種後20℃と30℃の温度下の組み合わせで比較検討したところ、20℃にすると脱外被ならびに二次から三次感染細胞への移行が遅れると報告している。さらに、20℃では、3次感染細胞群の壊死化が遅れ、ウイルスが移行し病斑が拡大すると報告している (Ehara & Misawa,

1975)。しかし、ウイルスの検出が極めて困難なため感染した細胞にウイルスが存在するという仮定に基づいて論じられている。

以上のよう、CMV感染における宿主反応については生理生化学的、並びに組織細胞学的研究は行われてきたものの、ウイルス増殖機構についてはゲノムのレベルではほとんど解明されていない。またCMVによるササゲやアカザの過敏感反応においては、TMV-タバコの感染系に比べウイルスの増殖がほとんど認められないため研究があまり進んでおらずその反応機構は今後の研究を待たねばならない。

Ⅲ 材 料 お よ び 方 法

1. 供 試 ウ イ ル ス と 供 試 植 物

ウ イ ル ス は、 キ ュ ウ リ モ ザ イ ク ウ イ ル ス の
普 通 系 (CMV-0)、 黄 斑 系 (CMV-Y)、 お よ び マ メ
科 系 (CMV-L) を 供 試 し た。

植 物 は、 タ バ コ (*Nicotiana tabacum* cv.
ky-57)、 サ サ ゲ (*Vigna unguiculata* cv.
Kurodane-sanjaku)、 な ら び に ア カ ザ
(*Chenopodium amaranticolor*) を 供 試 し た。 タ
バ コ な ら び に ア カ ザ は、 温 室 内 で 栽 培 さ れ 実
験 に 供 試 さ れ る 1 週 間 前 に グ ロ ー ス キ ャ ビ ネ
ット (昼 間 26℃、 照 度 12,000 lux、 14 時 間、
夜 間 21℃) に 移 し 栽 培 し た。 サ サ ゲ は、 播 種
後 グ ロ ー ス フ レ ーム 内 (24 時 間 照 射、 23℃)
で 栽 培 し 8 か ら 10 日 後 に グ ロ ー ス キ ャ ビ ネ ッ ト
(昼 間 27℃、 照 度 12,000 lux、 12 時 間、 夜 間
25℃) に 移 し、 完 全 に 展 開 し た 初 生 葉 を 供 試
し た。

2. ウイルスの精製

上記の CMV 各系統をタバコに接種、増殖させ、基本的には Lot 法 (Lot, et al., 1972) に従い粗精製し、さらにショ糖密度勾配遠心法により精製した。また、CMV はイオンを介し凝集し易いことから、精製用緩衝液にキレート剤として EDTA を加えた (Takanami & Tomaru, 1969)。なお、精製の操作は 4℃ 以下で行なった。すなわち、CMV 感染葉 50 g を 2 日以上 20℃ で凍結し、100 ml の 0.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 (0.1% 2-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA を含む)、100 ml のクロロホルムで摩砕し遠心分離 (3,000 g, 10 min.) した。得られた上清に Polyethylene glycol (6,000) を 10% (W/V) になるように加え、40 分間攪はん後、遠心分離 (17,000 g, 10 min.) した。得られた沈澱を 5 mM ホウ酸緩衝液 pH 9.0 (5 mM EDTA を含む) で十分に懸濁し、トリトン-X-100 を 2% (W/V) になるよ

うに加えて30分間攪はんし、遠心分離（17,000g, 10min.）した。上清を回収し、超遠心分離 [227,800g (Hitachi RP50 rotor, 50krpm), 90min.] した。沈澱を粗精製ウイルスとし、10mM EDTAを含むリン酸カリウム緩衝液 pH 8.0 で十分に懸濁した。

次にショ糖密度勾配遠心を行うため、あらかじめ Hitachi SRP28SA rotor 用チューブに、同緩衝液に溶解した10, 20, 30および40%ショ糖液を8mlずつ重層し一晚放置することで連続勾配を作成した。これに1チューブ当たり粗精ウイルス液2mlを重層し遠心後 [101,700g (28,000rpm), 100min.]、ISCO分画器を用いて紫外光254nmを吸収するウイルス画分を回収した。このウイルス液を再び超遠心分離 (227,800g, 90min.) し、得られた沈澱を精製ウイルスとした。これをリン酸緩衝液 pH 8.0 に懸濁し、紫外部260nmでの吸光度を測定し、CMVの吸光係数 ($E_{0.1\% / 260nm} = 5$) より濃度を調整し以降の実験に用いた。

上記の方法により、タバコ葉 1kg 当たり
200 - 300 mg のウイルスが得られた。

3. ウィルス RNA の抽出

ウィルス RNA の抽出は精製ウィルスから SDS -
フェノール法によって行った。なお、RNase に
よる分解を避けるために試薬ならびに器具は、
オートクレーブ滅菌ないしは乾熱滅菌した。

TN 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl)
に懸濁したウィルス液 (= 2 mg / ml) に等量の TE 飽
和フェノール (TE; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
pH 8.0) および 0.1 倍量の 10% SDS を加え激しく
振とう後、室温で 10 分間、次いで氷中に 5 分間
静置した。4℃, 12 K rpm で 5 分間遠心分離後水層
を採取し、再び TE 飽和フェノールを加え振とう
後遠心分離した。このフェノール抽出を再
度繰り返し、得られた水層に 2 倍量のエチルエ
ーテルを加え振とう後遠心分離し上清のエー
テルを除いた (この操作を以下エーテル抽出

と呼ぶ)。この操作を2回繰り返し、水層の0.1倍量の3M酢酸ナトリウム pH 5.2と2.5倍量のエタノールを加え、-70℃で15分間あるいは-20℃で一晩冷却後12Krpmで10分間遠心し沈澱を得た(この操作を以下エタノール沈澱と呼ぶ)。この沈澱を70%エタノールで洗い真空乾燥後、適量の滅菌水に懸濁した。濃度の測定は260nmの紫外部吸光度、 $1 A_{260} = 33 \mu g/ml$ として調整した。

4. CMV-0 RNA 2のクローニング

CMV-0 RNA 2のクローニングと塩基配列決定に関する一連の方法は、Gething, et al. (1980); Gubler & Hoffman (1983); Hanahan (1983); Sanger, et al. (1977); DeBorde, et al. (1986)に準じたkarasawa, et al. (1991)に従った。なお、ヌクレアーゼによる分解を避けるために試薬、ならびに器具は、オートクレーブ滅菌ないしは乾熱滅菌した。

(i) c D N A の 合 成 法

c D N A を 合 成 す る に 当 た り、 ウ イ ル ス R N A を セ
フ ァ ロ ー ス (C L - 2 B) を 用 い て ゲ ル ろ 過 し、 G e t
h i n g , e t a l . (1 9 8 0) の 方 法 に 従 っ て P o l y (A) を
付 加 し た。 こ れ を 鋳 型 と し て R N A に、 オ リ ゴ
d (T) プ ラ イ マ ー を 加 え、 逆 転 写 酵 素 に よ っ て
相 補 的 な シ ン グ ル ス ト ラ ン ド c D N A を 合 成 し た。
す な わ ち、 5 0 μ l の 水 に 溶 解 し た ウ イ ル ス R N A
1 0 μ g を 6 5 $^{\circ}$ C で 5 分 間 加 熱 後 急 冷 し、 等 量 の 2 x
P o l y (A) p o l y m e r a s e b u f f e r p H 7 . 9 (1 x ; 5 0
m M T r i s - H C l p H 8 . 2 , 1 0 m M M g C l ₂ , 2 5 0 m M
N a C l , 2 . 5 m M M n C l ₂ , 0 . 2 5 m M A T P , 1 2 5 μ g / m l
B S A) , 0 . 5 μ l の R N a s e I n h i b i t o r (1 0 0 U) 、
3 μ l の P o l y (A) p o l y m e r a s e (3 . 6 U) を 加 え て 3 7
 $^{\circ}$ C で 1 5 分 間 反 応 さ せ た。 4 μ l の 0 . 5 M E D T A p H
8 . 0 で 反 応 を 止 め、 フ ェ ノ ー ル 抽 出 お よ び エ ー
テ ル 抽 出 を 行 い 最 終 的 に エ タ ノ ー ル 沈 澱 に よ
り P o l y (A) ウ イ ル ス R N A を 得 た。

(i i) first strand DNA の 合 成

Poly(A) ウィルス RNA を 16 μ l の 水 に 溶 解 し
65 $^{\circ}$ C で 5 分 間 加 熱 後 急 冷 し た。こ れ に 10 μ l の
5xRTase buffer pH 8.3 (1x; 20 mM Tris-HCl
pH 8.2, 4 mM MgCl₂, 60 mM KCl), 0.5 μ l
RNase Inhibitor (100 U), 5 μ l 0.1 M DTT,
5 μ l oligo(dT)12-18 (5 μ g), 12.5 μ l 2 mM
dNTP, 1 μ l RTase (23 U) を 加 え、42 $^{\circ}$ C で 30 分 間
反 応 し、再 び 1 μ l の RTase (30 U) を 加 え て 同 様
に 反 応 さ せ た。0.8 μ l の 0.5 M EDTA pH 8.0 で
反 応 を 止 め、フ ェ ノ ー ル 抽 出、エ ー テ ル 抽 出、
エ タ ノ ー ル 沈 澱 し、RNA-DNA の ハ イ ブ リ ッ ト を
得 た。

(i i i) second strand DNA の 合 成

70 μ l の 水 に 溶 解 し た RNA-DNA ハ イ ブ リ ッ ト
に 20 μ l の 5x 2nd strand buffer (20 mM Tris -

HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 50
μg/ml BSA, 100 mM KCl), 2.5 μl 2 mM dNTP,
3 μl 5 mM β-NAD, 4 μl DNA polymerase I,
1 μl DNA Ligase (5U), 1 μl RNase H (1U) を加
え 14℃ で一晩反応した。4 μl の 0.5 M EDTA pH
8.0 で反応を止め、フェノール抽出 (2回)、
エーテル抽出、エタノール沈澱し ds cDNA を得
た。次に、ds cDNA を 16 μl の水に溶解し、
2 μl の 5x T4 DNA polymerase buffer, 1 μl
2 mM
dNTP, 1 μl T4 DNA polymerase (4U) を加え 37
℃ で 10 分間反応後、フェノール抽出 (2回)、
エーテル抽出、エタノール沈澱を順に行い平
滑末端の ds cDNA を得た。

(iv) cDNA の クローニング

cDNA を クローニング するために、TE に溶解
した平滑末端の cDNA を Takara ligation kit に
より EcoRI で消化した pBluscript II SK (+)

(Stratagene)に組み込み、*E. coli* (NM522)に形質転換した。すなわち、cDNAを組み込んだ pBSII 10 μ l を 90 μ l の competent cell に加え、静かに攪はん後氷中に30分間静置した。次に42℃で45秒間ヒートショックを与え10分間室温で静置した。次に、900 μ l の SOC 培地 (2% Bactotripton, 0.5% Bactoyeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 但し以下はフィルター滅菌 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) を加え 37℃ で1時間振とう培養し、Amp, LacZ 選択培地 [LB寒天培地 [(1.5% Bacto agar, 1% Bactotripton, 0.5% Bactoyeast extract, 10 mM NaCl) に 60℃ 以下で Ampicillin (100 μ g/ml), X-gal (50 μ g/ml), IPTG (100 mM) を加える] に接種し 37℃ で一晚培養後白色コロニー (Amp⁺, LacZ⁻) を選抜した。

(v) コロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニング

LB / Amp 寒天培地上にナイロンメンブレン (Hybond-N) を重ね、それに選抜したコロニーを接種した。なお、コロニーは、別の LB / Amp 寒天培地に植え継いでおいた。数時間培養後、新しくできたコロニーがずれないようにメンブレンを引き上げた。次にメンブレン上のコロニーの DNA を変性・固定するために、10% SDS 溶液、変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)、中和液 (0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl)、2xSSC (20xSSC; 3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate) でそれぞれ浸したろ紙上で、この順に5分間ずつ処理し、さらに80℃で2時間固定した。

ハイブリダイゼーションの手順は以下のようにして行った。メンブレンをプレハイブリダイゼーション溶液 [5x SSPE (20x SSPE; 3.6 M NaCl, 0.2 M NaH_2PO_4 , 20 mM EDTA pH 7.7), 1% SDS, 50% formamide, 5x Denhart's (50x: 1% BSA, 1% Ficoll 400, 1% polyvinylpyrrolidone), 100 $\mu\text{g/ml}$ denatured salmon sperm DNA] 中で42℃、6時間以上振とう後、 α - ^{32}P で標識した

プローブ DNA (約 10^6 cpm/ml) を加えたハイブリダイゼーション液 (1% Dextran sulfate を含むプレハイ溶液) 中で、 42°C 、20-24 時間振とうした。なお、DNA の標識は、マルチプライム DNA 標識システム (Amersham 社) に従って行い、約 10^8 cpm/ μg の比活性を得た。

次に、 $2\times\text{SSC}-0.5\%$ SDS で 5 分間室温で 2 回メンブレンを洗い、 $2\times\text{SSC}-0.1\%$ SDS、 55°C で 15 分、さらに $0.1\times\text{SSC}-0.5\%$ SDS、 55°C でバックのカウントが 200 cpm 以下になるまで洗い乾燥後オートラジオグラフィを行った。

(vi) プラスミド DNA の抽出

pBSII は、ファージとしての機能も持つことから正確にはファージミドと呼ばれるが、アルカリ-SDS 法 (Birnbom & Doly, 1979) によりプラスミド DNA として抽出できる。すなわち、選抜したコロニーを LB 液体培地に接種後 37°C で一晩振とう培養し、遠心分離 ($5,000\text{ rpm}$, 5

min)により集菌した。菌体をリゾチウム溶液 (10 mg/ml lysozyme, 1M Glucose, 0.1M EDTA, Tris-HCl pH 8.0)に懸濁し氷中に5分間静置後、2倍量のアルカリ-SDS溶液 (0.2M NaOH, 1% SDS)を加え静かに懸濁し氷中に5分間静置した。次いで1.5倍量の中和液 (3M Sodium acetate pH 4.8)を加え静かに懸濁後氷中に5分間静置し、遠心分離 (10,000 rpm, 5 min.)によって上清を得た。これに0.6倍量のisopropanolを加え15分間静置後、遠心分離 (10,000 rpm, 10 min.)し沈澱を70%エタノールで洗った。沈澱をTEに溶解し、フェノール抽出、エタノール沈澱後、再びTEに溶解しRNase A (10 ug/ml)を加え37℃で30分間処理することによりRNAを分解した。これに0.6倍量のPEG溶液 (20% Polyethylene glycol, 2.5M NaCl)を加え、30分間氷冷後遠心分離 (12,000 rpm, 10 min.)し、沈澱を十分に70% EtOHで洗いプラスミド (ファージミド) DNAを得た。なお、RNase A処理後の一部を制限酵素により消化してアガロース電気泳動し、

バンドのパターンにより目的のDNAを選抜した。

(Vii) DNA断片の切り出し法

DNAの必要な領域だけを回収するために、適当な制限酵素によって消化後、アガロース電気泳動からのDNA断片の回収を行った。すなわち、DNAを電気泳動後、そのゲルをEtBr液で1-2分染色し、目的のDNA断片の前後にWhatman DE81ペーパーを挿入した。さらに泳動を行いDNA断片をペーパーに吸着させた。次ぎに、ペーパーを100 μ lの洗浄用緩衝液(50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)で3回洗浄後、100 μ lの溶出用緩衝液(1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)で60℃5分間加温することにより溶出し余分なペーパーを遠心により除いた。フェノール・クロロホルム抽出後エタノール沈澱し目的のDNA断片を回収した。

5. 塩基配列の決定法

(i) デイレーションクローンの作成法

後述のダイデオキシターミネーション法によって cDNA クローンの塩基配列を読みとるために、pBSII に組み込んだインサートを末端から 200-300 bp ずつ削った一連のディレクションクローンを作成した。すなわちインサートから T7 プライマーの間にある 3' 突出制限酵素サイトと、そのサイトよりインサート側にある 5' 突出制限酵素サイトを消化後、Takara deletion kit を用いて、Exonuclease III によるインサートの分解、Mung bean nuclease および Klenow fragment による平滑末端処理、ライゲーション処理を順に行い、先述 [4, (iv)] 従ってディレクションクローンを得た。

(ii) 一本鎖 DNA の調整

pBSIIは、ファージとプラスミドの両方の性質を兼ね備えたベクターである。ヘルパーファージ(M13K07)の感染によりダイデオキシターミネーション法(後述)の一本鎖の鋳型DNAとして得ることができる。すなわち、F'因子を持つ新鮮なディレーションクロンを2x TY/Amp寒天培地(1.5% bacto agar, 1.6% Bacto tripton, 1.0% Bact yeast extract, 1.0% NaCl)で培養し、シングルコロニーを2mlの2x TY/Amp液体培地で一番振とう培養した。100 μ lの培養液を3mlのTYP液体培地(1.6% Bacto tripton, 1.6% Bact yeast extract, 0.5% NaCl, 0.25% K_2HPO_4)に加え30分間振とう培養し、M13K07(3×10^{10} pfu/ml)を50 μ l加えて30分間静置して感染させ一晚振とう培養した。数回培養液を遠心分離(12,000 rpm, 5 min.)することによって菌体を完全に取り除き、0.25倍量のPEG溶液を加え30分間静置後遠心分離(12,000 rpm, 10 min.)し、PEG溶液を完全に取り除いた。得られた沈澱をTEに溶解し、

0.5倍量のTE飽和フェノールを加え激しく振とうし、次いで0.5倍量のクロロホルム/イソアミルアルコール(49:1)を加え激しく振とう後遠心分離し、これを三回繰り返した。エーテル抽出後エタノール沈澱を行い、一本鎖DNAを得た。

(iii) 塩基配列決定法

塩基配列の決定は、ダイデオキシターミネーション法(Sanger, et al., 1977)に準じて行った。すなわち、7 μ lのH₂Oに溶解した一本鎖DNA(1 μ g)に、2 μ lの5x sequenase buffer (5x; 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 250 mM NaCl)と1 μ lのT7 primer(0.5 picomol/ μ l)を加え70℃で3分加熱後徐々に冷やすことによりアニーリング反応した。つぎに1 μ lのDTT, 3 μ lのラベリング混合液(1.5 μ M dATP, 7-deaza-dGTP, dTTP, 0.1 mM EDTA pH 7.5), 0.5 μ lの[α -³²P]-dCTP, 1 μ lのsequenase

Ver. 2.0 (USB, 1U) を加え室温で五時間反応しラベルした。次ぎに、あらかじめ用意した $2.5 \mu\text{l}$ の $d/dd\text{NTP}$ 混合液 ($20 \mu\text{M}$ $dd\text{NTP}$ それぞれについて $200 \mu\text{M}$ $4d\text{NTP}$, $1\times$ *sequenase buffer*) それぞれに $2.5 \mu\text{l}$ の反応液を分注し停止反応 (37°C , 5min) した。次ぎに $4 \mu\text{l}$ のホルムアミド色素液を加えて 80°C 3 時間加熱急冷し、 50% ウレア変性下ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [$(50\% \text{ urea}, 6\% \text{ polyacrylamide (acrylamide : bis} = 19:1)$), $1\times$ *TBE*, 0.05% *TEMED*, 0.1% *APS*)] した (2500V , 50W 定電力)。泳動後ゲルをろ紙上で乾燥させ、オートラジオグラフィーを行い、バンドを読みとることにより塩基配列を決定した。

また、ABI 373A DNA Sequencer (ABI) による塩基配列の決定については、所定の方法に従い、その反応に一本鎖 DNA を鋳型として Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) と蛍光標識ダイプライマー (*M13-21 primer*; ABI) を用いた。

また、RNA 2の5'末端の塩基配列については、DeBorde, et al. (1986)に従い、RNA 2を鋳型として5'末端から151-167番目に相補的な合成DNAプライマー、ならびにReverse transcriptaseを用いて反応後、上述のポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定した。

6. 植物組織からのtotal RNAの抽出。

植物組織からの全RNAの抽出は、Chomczynski & Sacchi (1987)の方法を改良して行った。すなわち、植物組織(=0.2g F.W.)を液体窒素で粉碎し、5倍量(W/V)の抽出液(4 M Guaninidium Thiocyanate, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM Sodium citrate pH 7.0, 0.1 M 2-Mercaptoethanol, 0.5% Sarcosyl)を加え、振とう後、5倍量(W/V)の90% phenol, 0.5倍量の2 M Sodium acetate pH 4.0, 1倍量(W/V)のchloroform/isoamylalcohol(49:1 v/v)を加え、激しく振とうし8,000 rpmで10分間

遠心した。上清を採取し等量の isopropanol
(-20℃)を混合し、-20℃で1時間冷却後、4℃
8000rpmで10分間遠心分離した。得られた沈澱
を4M LiClで懸濁後、4℃ 6,000rpmで15分間遠
心分離した。上清を取り除き最終的に70%
EtOHで洗いこの沈澱をTotal RNAとした。濃
度の測定は、紫外部吸光度 $1A_{260} \text{ unit} = 45$
 $\mu\text{g/ml}$ として調整した。

7. RNAブロット分析

ノザンブロットハイブリダイゼーション並
びにドットハイブリダイゼーションにより
CMV RNAの分析を行った。すなわちTotal RNA
を、脱イオン処理した1M glyoxal, 1x TAE(1
2mM Tris-HCl, pH7.0, 6mM Sodium acetate,
0.3mM EDTA) 50%DMSOで変性(50℃, 15分間)
後急冷し、変性RNA試料を調整した。ノザン分
析については、変性RNA試料を1.2%アガロース
ゲル電気泳動(50V定電圧)後、キャピラリー

ブロットによりナイロンメンブレン (hybond-N) 上に転写した。なお、泳動の際両極での緩衝液の pH が変化し安く、pH 8.0 以上になると Glyoxal が RNA から解離するため、緩衝液を 30 分ごとにサーキュレイトした。また、ゲルの染色については、50 mM NaOH で 30 分間処理することにより glyoxal をはずし、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 で中和後 EtBr (1 μ g/ml) で染色した。染色したゲルは、ブロッティングの効率が悪くなることから、別に用意した。ドット分析については、上述のようにして変性した RNA を直接メンブレンにブロットした。

次ぎに RNA を固定するためにメンブレンを 80 $^{\circ}$ C で 2 時間 baking 後、glyoxal を除くためにアルカリ液 (50 mM NaOH) に 15 秒間浸し、その後中和液 (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 2x SSC) に 45 秒間以上浸してから乾燥させた。

ハイブリダイゼーション、洗い、オートラジオグラフィの手順はコロニーハイブリダイゼーション法と同様に行った。

得られたバンドの面積をデンストメーターにより測定することでRNA量とした。また、ドット分析に関しては、各スポットの比活性を、Cerenkov radiationにより測定し、これをRNA量とした。

8. 外被タンパク質の定量法

CMVの外被タンパク質量はCMV-Yの抗体を用いてエライザ法(Koenig & Paul, 1982)により定量した。すなわち感染葉をコーティング緩衝液(50 mM Na_2CO_3 , pH 9.6)とともに磨砕し、遠心分離(6,000 rpm, 5 min.)により残さを除いた。上清を1000倍に希釈し96穴マイクロプレートに200 μ lずつ入れ25℃で1時間静置しプレートにタンパク質を固定した。その後TTBS(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.05% NaN_3)を加え5分間静置後吸引除去する操作を3回繰り返すことによりプレートを洗浄した。次にTTBSで10倍希釈した健全

葉粗汁液で5000倍に希釈したCMV-Yの抗体を200 μ lずつ入れ、25℃で1時間静置して一次抗体を反応させた。TTBSで3回洗浄後、TTBSで1000倍希釈した二次抗体（アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG）を200 μ lずつ入れ25℃で1時間静置し二次抗体反応をした。TTBSで2回洗浄し、さらにAP（0.1M Tris-HCl pH9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂）で洗浄後、基質液（1mg/ml パラニトロフェニルリン酸, 10%ジエチルエタノールアミン pH9.8）を200 μ lずつ加えて発色した。30-60分後、3M NaOHを100 μ lずつ加えることにより反応を停止し、エライザ用分光光度計を用いてA₄₀₅の値を測定することにより感染葉中のCMVの外被タンパク質量を定量した。

IV 結 果

1 . C M V - 0 の ゲ ノ ム 構 造

日 本 に 発 生 す る C M V は、 普 通 系 統 (C M V - 0) が も
っ と も 多 く、 本 系 統 に よ る 被 害 は 大 き い。 こ
れ ま で ゲ ノ ム R N A 1 - 3 の う ち R N A 1 と 3 に つ い て
は 全 塩 基 配 列 が 決 定 さ れ、 そ れ ら は サ ブ グ ル
ー プ I の も の と 極 め て 高 い 相 同 性 が 認 め ら れ
た。 C M V - 0 の 遺 伝 情 報 を 解 析 す る に は 全 ゲ ノ ム
の 塩 基 配 列 を ま ず 決 定 し な け れ ば な ら な い。
そ こ で、 供 試 ウ イ ル ス C M V - 0 に つ い て、 こ れ ま
で 不 明 で あ っ た R N A 2 の 塩 基 配 列 を 決 定 し、 他
の ク ク モ ウ イ ル ス 群 の ウ イ ル ス と の 間 で 比 較
検 討 し た。

1 . 1 C M V - 0 R N A 2 の ク ロ ー ニ ン グ と シ ー ケ ン ス

C M V - 0 R N A 2 を ク ロ ー ニ ン グ す る に 当 た り、

精製ウイルス試料から SDS-フェノール法により CMV 全 RNA を抽出し、セファロース (CL-2B) カラムを通しゲルろ過を行った。この精製 CMV 全 RNA をクローニングに供試した。すなわち精製 CMV RNA 試料に poly(A) を付加後、Oligo(dT) をプライマーとして first strand cDNA、second strand cDNA 合成を行い、得られた cDNA を EcoRV で消化した pBluescript II sk(+) にライゲーション後、大腸菌 NM522 に形質転換した。次に RNA 2 の一部を含む 0.6 Kbp の cDNA (Hayakawa, T. personal communication) をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行い、RNA 2 のクローンを選抜した。さらにそれらからファージミド DNA を抽出し、ベクターの EcoRV サイトの両端から数 100 bp にある PvuII サイトで消化後、インサート DNA 断片を回収した。RNA 2 は、その電気泳動のバンドの移動度から約 3 Kb であると推定されることから、これを基に完全長に近い DNA を選抜した。Fig. 1 は、6 つのクローンのインサート DNA の電気

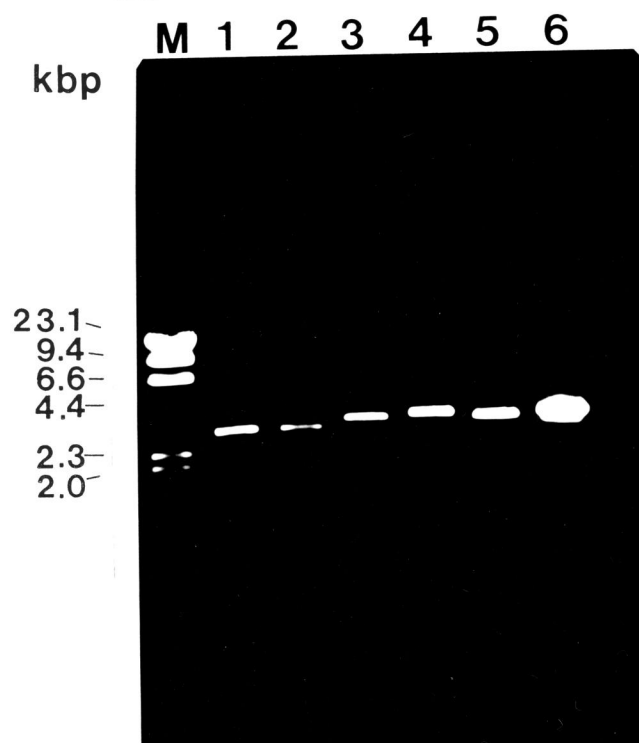


Fig.1 Agarose gel elctrphoresis of cDNA of CMV-O RNA 2. The cDNA included the region between two *Pvu*II sites of pBSII vector. M, *Hind*III fragments of λ DNA; (1-6), cDNA 2-13,-86,-152,-239,-275,-300, respectively.

泳動パターンを示しており、cDNA 2-239が最も完全長に近いと考えられた。次にこのcDNAを用いて制限酵素地図を作成した。すなわち、*EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *XhoI*, *XbaI*, *KpnI*, *ApaI*, *BamHI*, の制限酵素を用いて消化し電気泳動によりDNA断片の長さを解析することによって作成した (Fig. 2)。その結果、*XbaI*, *ApaI*, *BamHI*を除く供試制限酵素サイトが存在した。また、CMV-Y RNA 2のそれと比較すると、唯一 *XbaI* サイトが、CMV-0においては存在しないことが異なる点であった。

次に塩基配列を決定するため制限酵素地図を基にクローン239を *HindIII* で消化し3'側と5'側をそれぞれ含む2つのクローンDNAにわけた (Fig. 2)。さらに pBSIISK(+) のマルチクローニングサイトにある3'ないし5'突出制限酵素、すなわち前者のクローンでは *ApaI*, *XhoI*、後者のクローンでは *ApaI*, *HindIII* で消化後、ディレクションシリーズを作成した。また逆鎖を読むためにクローン239の *BamHI* - *ApaI* 断片を

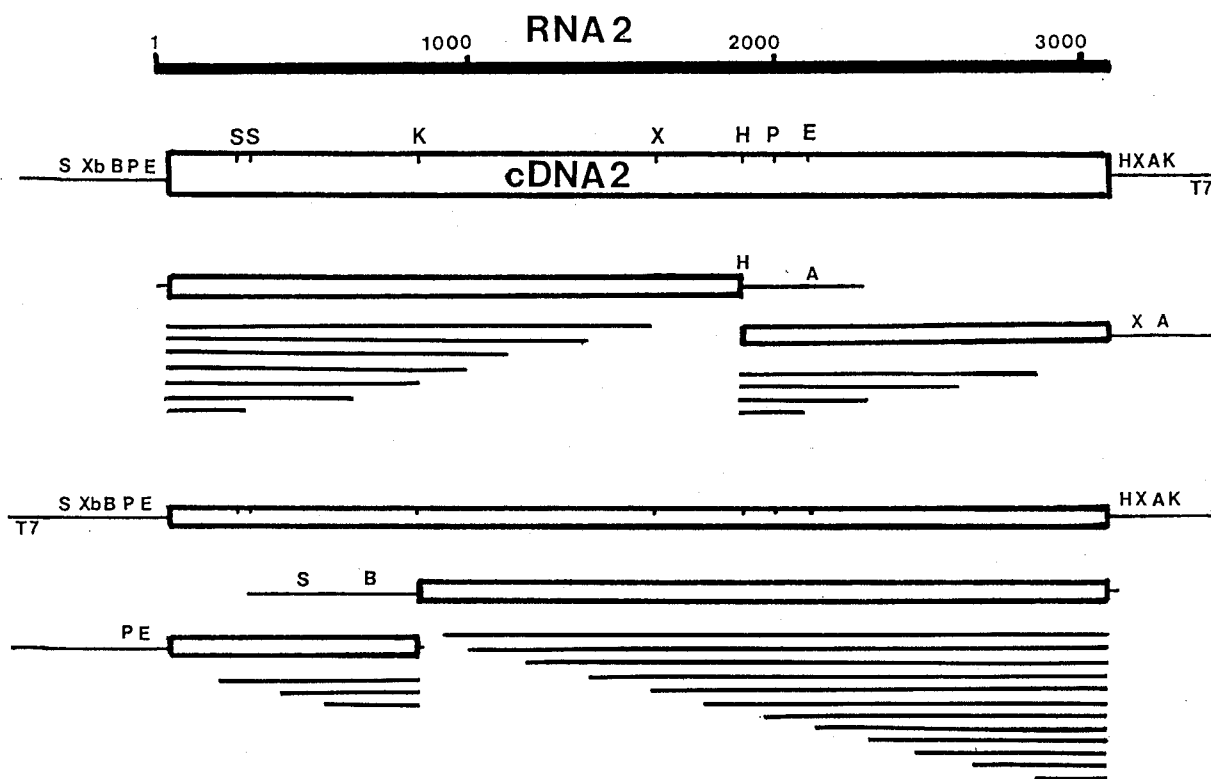


Fig.2 Restriction map of cDNA 2 corresponding to CMV-O RNA 2 and ordered set of overlapping deletion mutants. A, *ApaI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; P, *PstI*; S, *SacI*; X, *XhoI*; Xb, *XbaI*; T7, T7 primer of pBSII vector.

pBSII ks(+)にサブクロニングしたのち
KpnIで消化し、同様にして2つのクローン
DNAにわけ、前者をSacI, BamHI、後者をPstI,
EcoRIで消化後、ディレーションシリーズを作
成した。それぞれのミュータントクローンか
ら一本鎖DNAを調製し、これを鋳型としてダイ
デオキシ法により塩基配列を決定した。3'末
端の配列については、Fig. 1に示したクロー
ンについてそれぞれ配列を決定したところ、
Poly(A)につづいてCC配列が認められた。クク
モウイルスグループの3'末端配列はCCA 3'で
おわることを考慮し、CMV-0 RNA 2の3'末端は、
CCAであると判断した。5'末端の塩基配列につ
いては、RNA 2の152-162番目に相補的な合成
プライマー(5' GTTCCACATCCTCGGGA 3')を作成
し、RNAの直接シーケンスにより決定した。

以上のようにして決定されたCMV-0 RNA 2の
全塩基配列およびそれから予想される翻訳産
物のアミノ酸配列をFig. 3に示した。CMV-0
RNA 2は3,049ヌクレオチド(nt)からなり、85

Fig.3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the predicted 2a protein. The converted polymerase motifs are underlined. The numbers indicate the position of the nucleotide from the 5' end.

ntの 5' non-coding region に つ づ い て 2,571 ntの ORFが 存 在 し 393ntの 3' non-coding regionが 続 い た。 こ の ORFは Mr. 96,777の 857 amino acidsを コ ー ド し て い る。

1.2 CMV-0 RNA 2と 他 の ク ク モ ウ イ ル ス グ ル ー プ の RNA 2の 比 較

CMV-0 RNA 2と 他 の ク ク モ ウ イ ル ス グ ル ー プ の RNA 2の 間 で 塩 基 配 列 な ら び に ORFの ア ミ ノ 酸 の 相 同 性 を 比 較 し た 結 果 を Table 1 に ま と め た。 CMV-0 RNA 2は、 PSV、 TAVお よ び CMVサ ブ グ ル ー プ IIの CMV-Qに 比 べ、 サ ブ グ ル ー プ I に 属 す CMV-Yや CMV-Fnyと 99%の 極 め て 高 い 相 同 性 を 示 し た。 ORFの ア ミ ノ 酸 配 列 で は、 CMV-Y, -Fnyの そ れ ら と 比 べ さ ら に 相 同 性 が 高 く な っ た。 Fig. 3 で ア ン ダ ー ラ イ ン し た ア ミ ノ 酸 配 列 は、 RNAポ リ メ ラ ー ゼ の コ ン セ ン サ ス シ ー ケ ン ス エ レ メ ン ト で あ り、 こ の 配 列 は、 い く つ か の 球 状 ウ イ ル ス の 中 で ほ と ん ど 完 全 に 保 存

Table 1
Identity of RNA 2 and 2a protein of CMV-O with those of cucumoviruses.

Cucumoviruses	C M V - O		
	RNA 2(%)	2a protein(%)	ref.
CMV-Y	98.4	99.5	Kataoka, J. <i>et al.</i> 1990
-Fny	98.0	99.1	Rizzo, T.M. & Palukaitis, P. 1988
-Q	71.4	73.6	Rezaian, M.A. <i>et al.</i> 1984
PSV-J	59.8	55.4	Karasawa, A. <i>et al.</i> 1992
TAV-V	59.0	57.3	Moriones, E. <i>et al.</i> 1991

されている (Kamer, et al., 1984; Morch, et al., 1988)。CMV-0のそれは、CMV-Y, -Fnyのそれに対し1アミノ酸の不一致しか認められず、それらはほとんど同じ機能をもつと推測される。

5'並びに3' non-coding region について CMV-0とほかのCMV系統との間でアライメントを行い Fig. 4にまとめた。CMV-0の5' non-coding regionは、CMV-Y, -Fnyに比べ1-2 nt短く、2-4 ntの置換ならびに1-2 ntの欠損部位が5'末から60-65番目に集中していた。この領域の重要性については現在のところ明かではない。3' non-coding region についてはCMV-0, -Y, -Fnyとも同じ長さであり、393 nt中6 ntの塩基置換が散在していた。

1.3 考察

CMV-0 RNA 2の塩基配列が決定されたことによつてCMV-0の全ゲノムの遺伝情報が明かとな

った。ゲノム構造をまとめると Fig. 5 のようになる。

ゲノム各セグメント間の non-coding region を比較すると、5' non-coding region においては RNA 1 が 96 nt、RNA 2 が 85 nt、RNA 3 が 122 nt、RNA 4 が 76 nt でありそれぞれにおいて長さが異なっている。また、相同性は RNA 1 と 2 の間で 72% であるが、その他の組み合わせは 50% 以下で相同性は低い。RNA 1 と RNA 2 のこの領域には、他の CMV や BMV において知られているプラス鎖 RNA の合成に対するプロモーター配列が保存されていた (Pogue, et al., 1990)。3' non-coding region についても、長さは異なっているが、3' 末端側は極めて相同性が高い。このよく保存された領域には tRNA 様構造をとることが知られており (Hayakawa, et al., 1989)、RNA 2 においても同様の構造をとると考えられる。BMV に関する研究では、マイナス鎖の合成に関して重要な配列のマップが明らかになっていが (Rao, et al., 1989)、

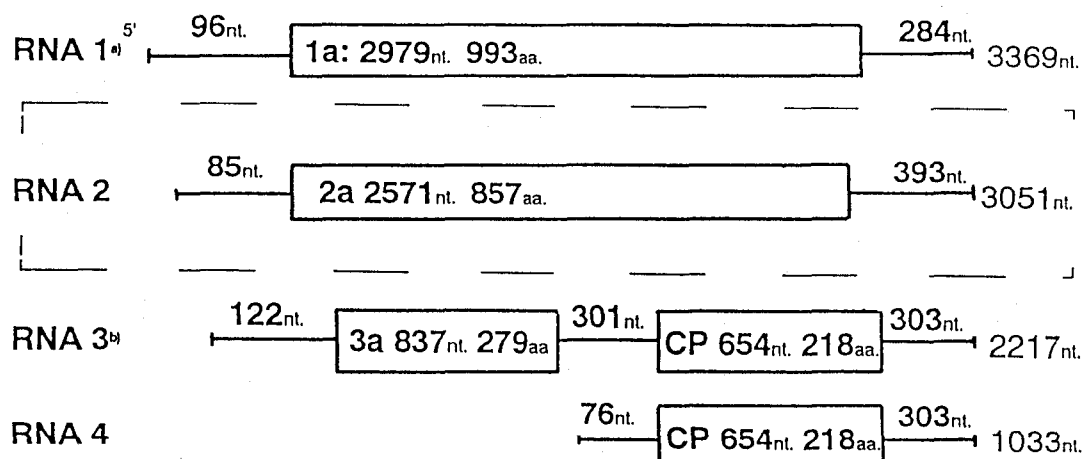


Fig.5 Schematic representation of CMV-O RNAs. The numbers are the number of nucleotide (nt.) or amino acid (aa.) residues. a);b), Hayakawa,T. *et al.* 1989; 1990.

CMVについては不明である。

一方、5'側に進むにつれて塩基の違いが若干認められている。特にRNA 1の3148-3158番目の領域は、RNA 3においては欠損していることがすでに示されているが(Hayakawa, et al., 1989)、RNA 2においても欠損していた。non-coding regionにおける塩基レベルでの多様性は、プラス鎖およびマイナス鎖の合成や、各ゲノムがコードするタンパク質の合成に何らかの影響を与えるのかもしれない。

CMV-0のRNA 1, 2, 3それぞれに対する他のクモウイルスグループとの相同性を比較すると、RNA 2において示した結果は、RNA 1およびRNA 3での結果とほぼ同様であった。すなわち相同性はPSVに対しては60-67%、TAVに対しては59-68%であった(Karasawa, et al., 1991, 1992; O'Reilly, et al., 1991; Moriones, et al., 1991; Bernal, et al., 1991)。それに対し、CMVサブグループIIのCMV-Qに対しては、相同性が71-76%と高くなった。さらに、CMVサブグ

ループ I の CMV-Y, -Fny に対しては 91-98% と、
極めて高い値でほとんど一致していた。

以上のよう、CMV-0 のゲノムの塩基配列決定によって、特にサブグループ I の間での塩基ならびにアミノ酸が置換されている部位をかなり限定することができる。これらの遺伝情報は、系統間にみられる種々の性質の違いを導くウイルス側の因子を限定するための基礎資料となるだろう。

2 . C M V 接 種 タ バ コ 葉 組 織 に お け る ウ イ ル ス 増 殖 の 解 析

C M V - O R N A 2 の ゲ ノ ム 構 造 を 決 定 し た こ と に
よ り、 C M V - O R N A 1 - 3 の す べ て の 構 造 が 明 か と
な っ た。 こ れ ら の ゲ ノ ム 各 セ グ メ ン ト が、 感
染 葉 に お い て、 ど の よ う な 経 過 を 経 て 発 現 し
て い く の か、 こ れ ま で あ ま り わ か っ て い な い。
特 に 感 染 初 期 で は ウ イ ル ス 粒 子 の 生 成 量 は 少
な く ウ イ ル ス 粒 子 を 検 出 す る こ と は 一 般 に 困
難 で あ る。 近 年 ウ イ ル ス ゲ ノ ム の c D N A を 32 P で
標 識 し た プ ロ ー ブ を 使 用 し て i n t a c t な 植 物 中
か ら も ウ イ ル ス R N A を 検 出 す る こ と が 可 能 に な
っ た。 本 章 で は、 接 種 葉 に お け る ウ イ ル ス 増
殖 機 構 を 解 析 す る た め、 C M V に 全 身 感 染 す る タ
バ コ で の 病 徴 と、 ウ イ ル ス ゲ ノ ム、 活 性、 外
被 タ ン パ ク 質 (C P) の 経 時 変 化 を 調 べ た。

2 . 1 病 徴

完全に展開したタバコ葉 (*N. tabacum* cv. ky-57) に CMV-0, -Y を接種し、その病徴を観察した (Fig. 6)。CMV-0 接種タバコ葉において、非接種上位葉には退緑を伴うモザイクが形成されるが、接種葉に対しては無病徴であった。一方、CMV-Y を接種すると接種後4日目より接種葉に局所的に黄化が観察され始め、その後その数が増加するとともに拡大し黄色斑を形成した。また上位葉には黄色モザイクが形成される。

2.2 一次感染組織におけるウイルスゲノムの合成

接種葉組織におけるウイルスの感染は、接種面表皮組織細胞から始まり、続いて柵状組織、海綿状組織へと水平方向および垂直方向に拡大する。全身感染では、さらに経過するにつれウイルスは根および地上部全域に拡大していく。すなわちウイルスの侵入細胞であ

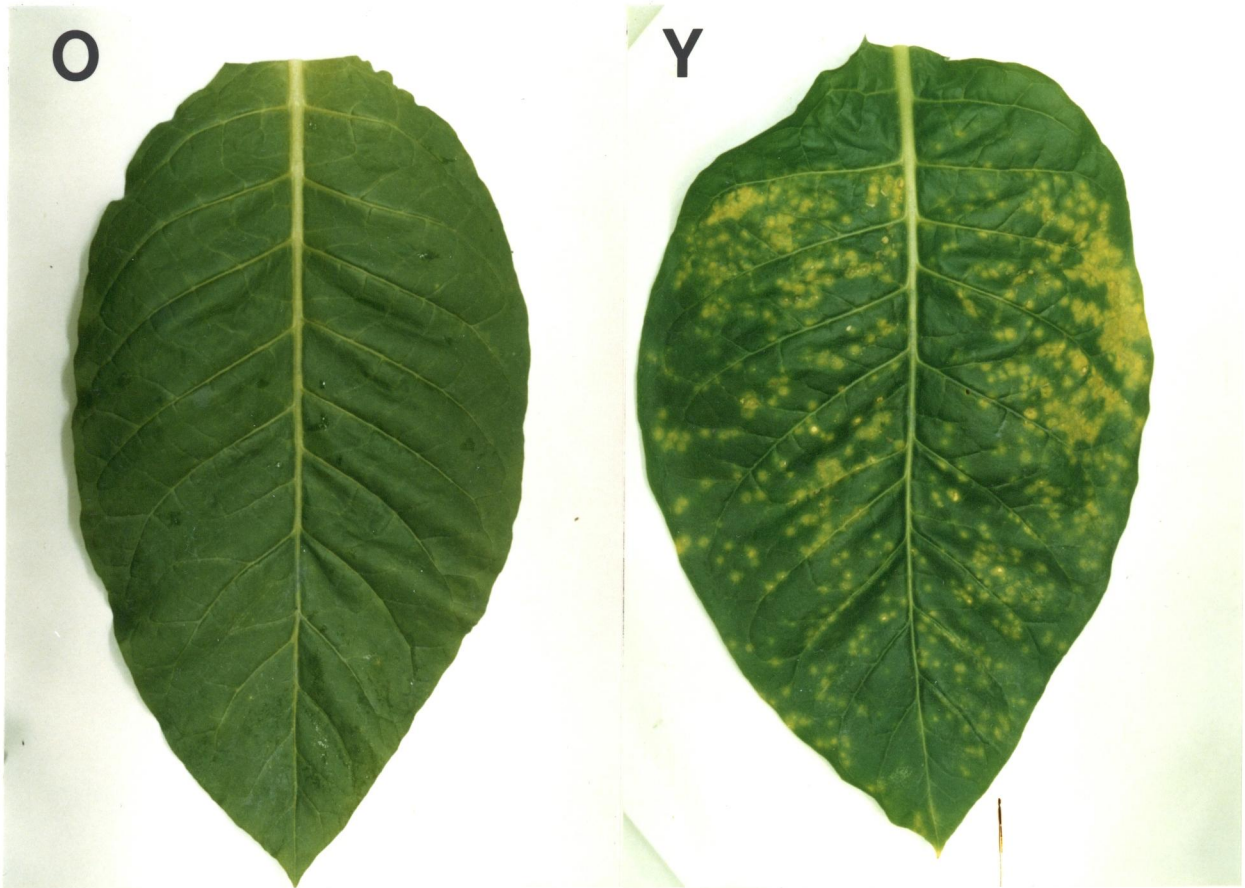


Fig.6 Inoculated leaves of tobacco(*N. tabacum* cv. ky-57) with CMV-O(O) and CMV-Y(Y) at 6 days post inoculation.

る表皮組織の一次感染細胞からその周辺および下部の葉肉組織に向けて二次、三次と逐次感染組織細胞が増加する。このような組織内伝播におけるウイルスゲノム合成の経緯をノザンハイブリダイゼーション法により解析した。CMV-0 (100 μ g/ml) をタバコ葉裏面に接種後、経時的に裏面表皮を剥離し表皮組織と葉肉部の全RNAをそれぞれ抽出した。各全RNA 20 μ g をグリオキサルで変性し1.2%アガロース電気泳動後、ナイロンメンブレン (Hybond-N) に転写した。Fig. 7は、ウイルスゲノム各セグメントを検出するためのプローブとして調整したCMV-0のcDNA 1, 2, 3の構成を示している。ウイルスRNA各セグメントの3'側は高い相同性を示すことから、それぞれを特異的に検出できるようにその領域を除く5'側から1.8 kb程度のcDNAに構築した。また、電気泳動におけるRNA 1と2の移動度は近接しているため、同条件下で泳動後ブロットしたメンブレンを2組作成し、cDNA 1と3およびcDNA 2と3の組み合わせ

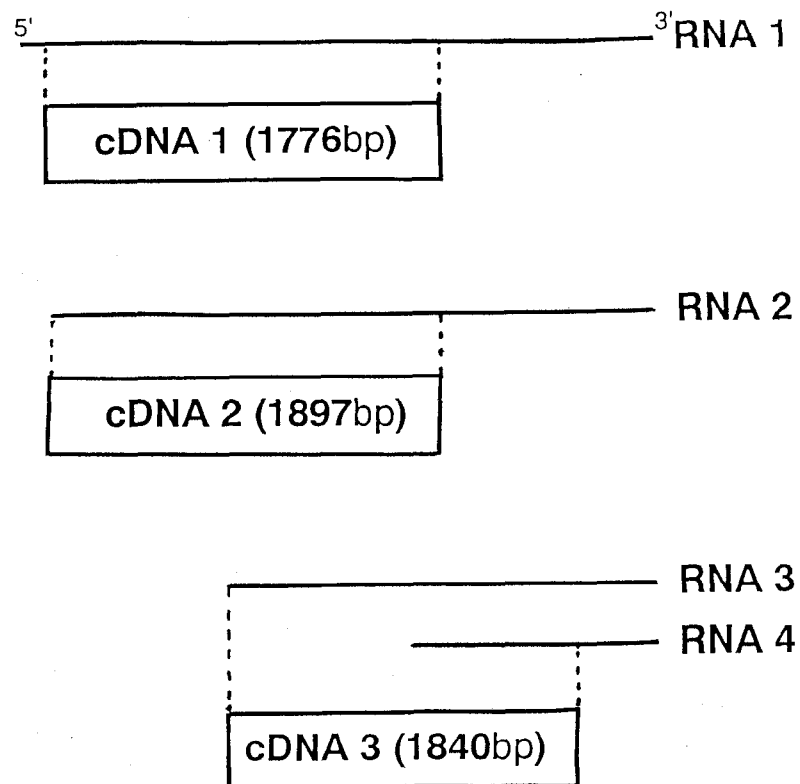


Fig.7 Schematic representation of the probe DNAs of CMV RNA segments for northern blots. The CMV RNA segments and the probe DNAs were shown by lines and boxes, respectively.

せでハイブリダイゼーションを行い、それぞれ RNA 1, 3, 4 と RNA 2, 3, 4 を検出した (Fig. 8A, B)。なお、ウイルス RNA 量は、接種葉の全 RNA から検出するので、粒子形成した RNA とフリーの RNA を含めた量として考えられる。Fig. 8A は、接種後 0, 12, 18, 24, 48 時間目の表皮ならびに葉肉部のウイルス RNA を表している。図では見にくいですが、表皮では接種後 12 時間から、葉肉部では 18 時間から RNA 各セグメントのバンドが経時的に検出され、RNA 3 のバンドが最も濃く思われた。同様にして、Fig. 8B は、0, 6, 12, 18, 24, 30 時間目の結果を示している。表皮において 6 時間目ではウイルス RNA のバンドは検出されなかった。このことから、一次感染組織では、接種後 12 時間目からバンドが検出され、二次以降の感染組織では 18 時間目よりバンドが検出され始めることが示された。

次に Fig. 8A, B のデータを含め 3 回の反復実験の結果より得られたバンドの面積をフライングスポットスキャナーで測定し、接種後 48

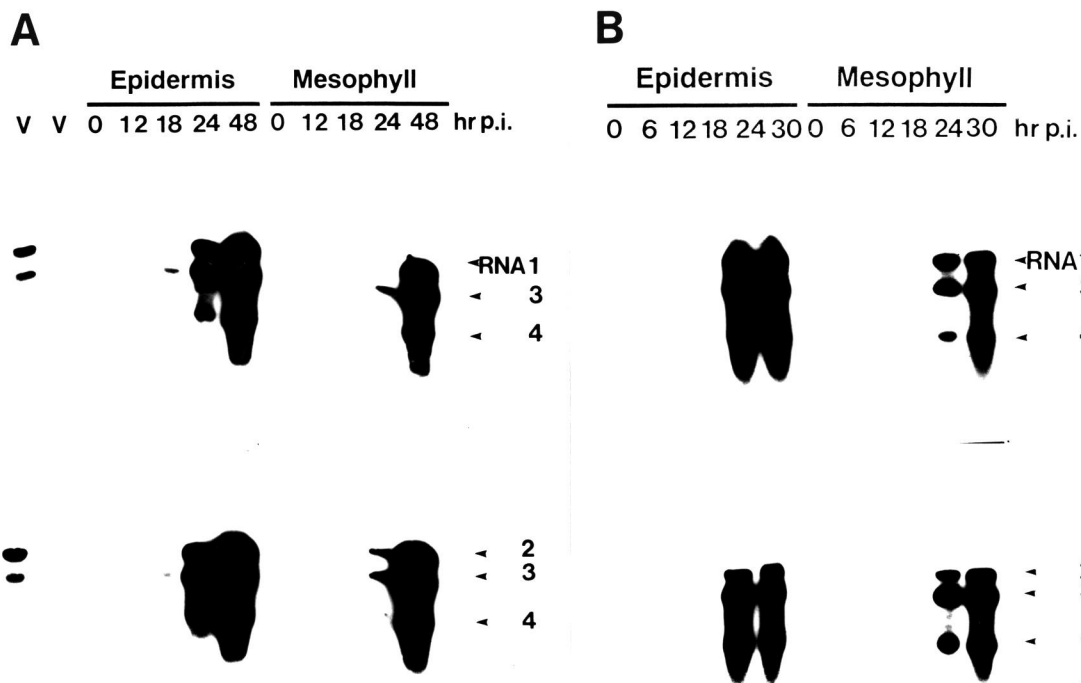
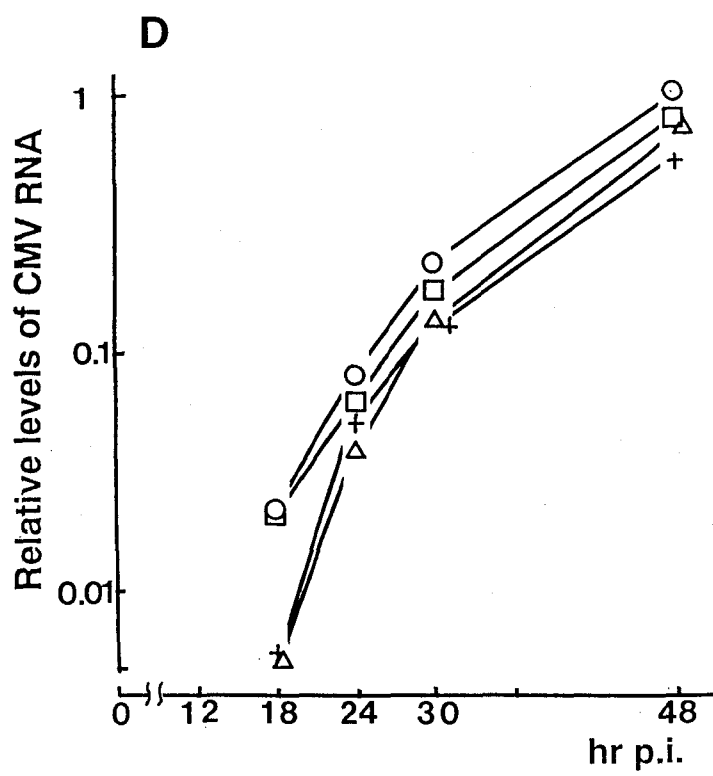
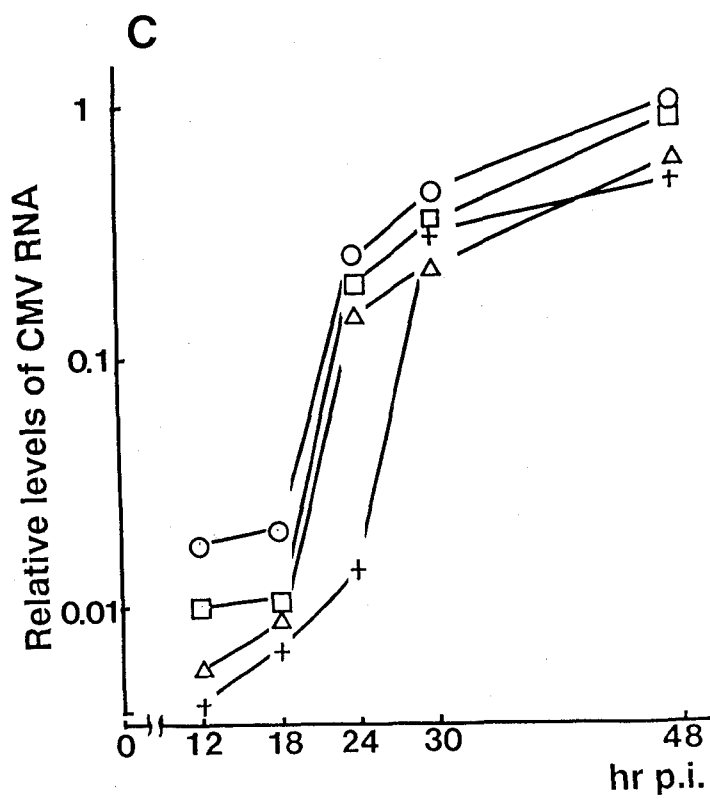


Fig.8 Time course of synthesis of CMV-O RNA segments in inoculated tobacco leaves. (A and B) Autoradiogram of northern blots with RNA (20 μ g/well) extracted from epidermis and mesophyll cells. Virion RNA was applied to lane V. (C and D) The relative levels of RNA 1 (\square), RNA 2(Δ), RNA 3(\circ) and RNA 4(+) of epidermis (C) and mesophyll (D) cells quantitated from blots. The maximum levels of RNA 3 expressed from epidermis and mesophyll were set as 1, respectively.



時間目の表皮、並びに葉肉部のRNA 3のバンドの面積をそれぞれ1.0としてRNA各セグメントのバンドの相対的な面積を求めることによりウイルスRNAの合成量の経時変化を追跡した。

Fig. 8 Cは、表皮組織でのウイルスRNA合成量のグラフである。RNA各セグメントとも、12時間目より検出され始め18時間目より合成が活発になっている。その合成の過程でRNA 3の合成量は最も多く、ついでRNA 1, 2, 4の順に多かった。

Fig. 8 Dは葉肉部でのウイルスRNAの合成パターンを示している。接種後18時間目より検出され、表皮での結果と同じくRNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4の順に合成量が優先した。これらのことより、一次感染組織において、特にRNA 3の合成が優先しながら、全ウイルスゲノムが増加していく様子がわかった。

2.3 リーフディスクにおける感染初期のウイルスゲノムの合成

ウイルスの組織内伝播領域を限定するため、タバコ接種葉からリーフディスク（径 1.5 cm ）を切り取り、感染初期のウイルスゲノムセグメントの合成を解析した。すなわち CMV-0（ $100 \mu\text{g/ml}$ ）接種タバコ葉から切り抜いたリーフディスクを培養し、0 から 48 時間まで 6 時間ごとに全 RNA を抽出した。各 $20 \mu\text{g}$ の全 RNA を電気泳動後ノザン分析を行った結果（Fig. 9A）、接種 12 ないし 18 時間後より RNA 各セグメントが検出され、それ以降バンドが濃くなっていくことが認められた。また RNA 3 のバンドが最も濃く検出された。接種 48 時間目の RNA 3 の合成量を 1.0 として相対的な経時変化を表した結果、ウイルス RNA 各セグメントは RNA 3 の合成が最も優先し、ついで RNA 2 と 1 がほぼ同量で、RNA 4 の合成がもっとも遅れた（Fig. 9B）。すなわち合成量は高い順に RNA 3 > RNA 2, 1 > RNA 4 になっていることが示された。

黄色斑を伴う CMV-Y 接種タバコリーフディスク

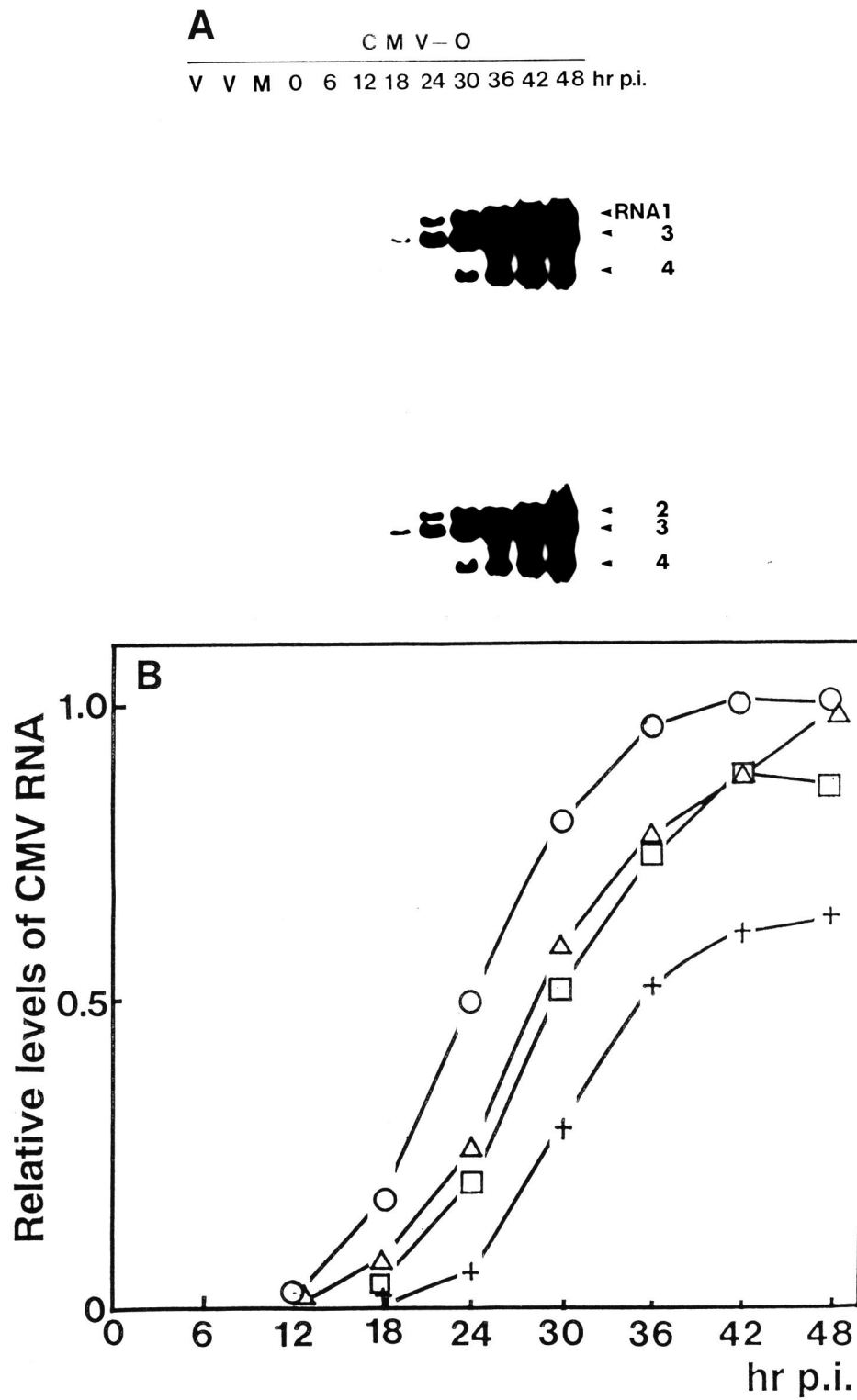


Fig.9 Time course of synthesis of CMV-O RNA segments in inoculated tobacco leaf disks. (A) Autoradiogram of northern blots with RNA (20 μ g/well) extracted from mock(M) and inoculated. Virion RNA was applied to lane V. (B) The relative levels of RNA 1 (□), RNA 2(Δ),RNA 3(○) and RNA 4(+) quantitated from (A). The maximum level of RNA 3 expressed was set as 1.

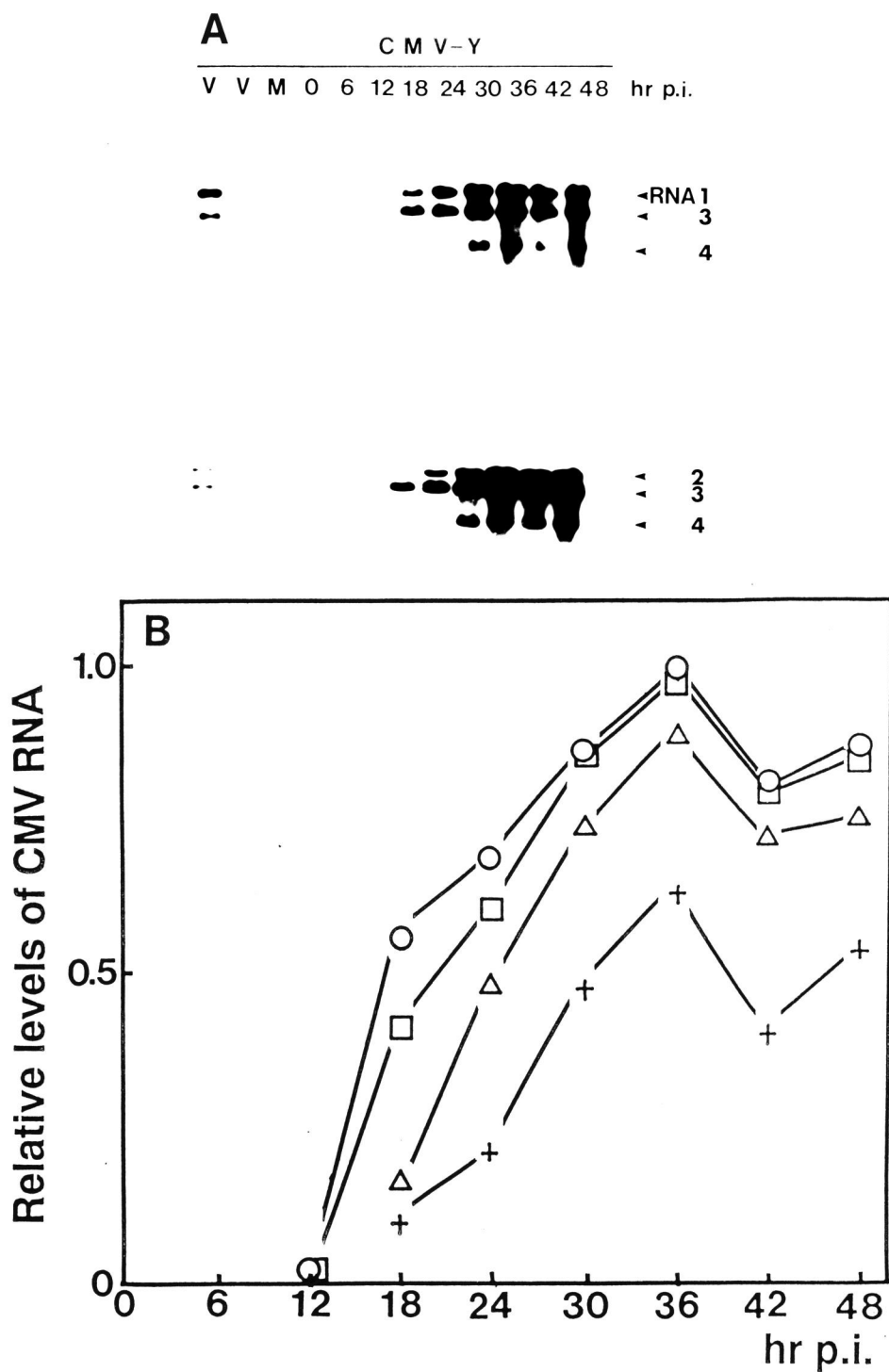


Fig.10 Time course of synthesis of CMV-Y RNA segments in inoculated tobacco leaf disks. (A) Autoradiogram of northern blots with RNA (20 μ g/well) extracted from mock(M) and inoculated. Virion RNA was applied to lane V. (B) The relative levels of RNA 1 (□), RNA 2(△),RNA 3(○) and RNA 4(+) quantitated from (A). The maximum level of RNA 3 expressed was set as 1.

クを用いてCMV-0接種の場合と同様にゲノム各セグメントの経時変化を検討した。その結果、接種12-18時間後よりウイルスRNA各セグメントとも検出され、合成量は高い方からRNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4の順になっていくことが示された (Fig. 10)。接種42時間目の各セグメントの合成量が減少しているが、これはゲルのウェルに流した全RNA量が何らかの理由で少なかったためと思われる。CMV-0, -Yとも感染初期においてはRNA 3の合成が最も優先しRNA 4は最も遅れる点で同様のパターンで合成されていくことがわかった。

2.4 接種葉と接種リーフディスクでのウイルスゲノム合成

全身感染系では、ウイルスが広範囲に移行増殖する。上記にも示したようにリーフディスクにおけるウイルスの移行はその組織内に制限され、感染が経過するにつれて接種葉と

接種リーフディスクでのウイルス増殖の経緯が異なってくると考えられる。そこでCMV-0 (100 μ g/ml) をタバコ葉ならびにリーフディスクに接種し、一日ごとに全RNAを抽出後1 μ gずつ電気泳動し、ノザン解析した。Fig. 11は、ウイルスRNA各セグメントのバンドの面積を加えたものをCMVの全RNAの合成量とし、それぞれの最大合成量を1.0として経時的に示したグラフである。接種葉試料中のCMV全RNAは、接種後1日目より増加し、4-6日に定常期を迎え再び増加して8日に最大に達した。一方、リーフディスク試料では、8日目の最大合成量に対する4-6日目の定常期の合成量の割合は接種葉組織にくらべ高いが、合成パターンは同様に接種後1日目より増加し、4-6日に定常期になるかに見えたがその後再び増加して8日に最大に達した。なお、RNA各セグメントの合成量の比較については、差の変動が大きく、特にRNA 4の合成量が他のセグメントに比べ一定とならずその傾向をつかむことはできなかった。

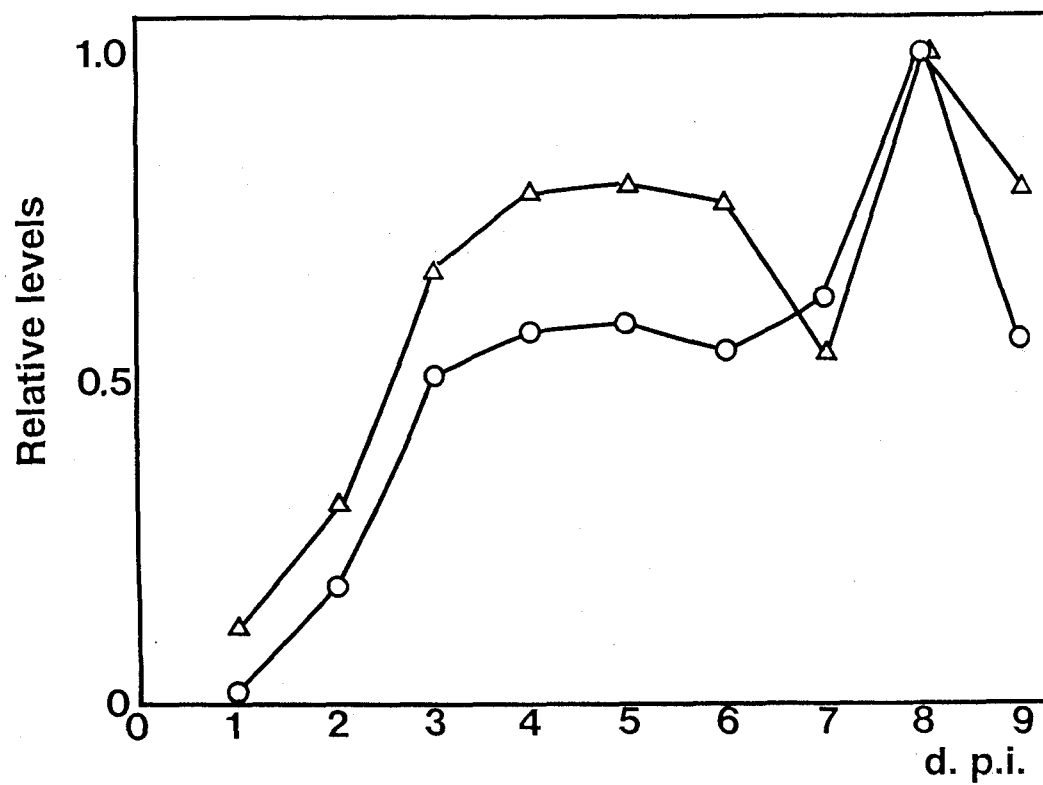


Fig.11 Time course of relative levels of total CMV-O RNA synthesis in inoculated leaves and leaf disks. The levels of total CMV RNA were determined by summing the amounts of each RNA quantitated from northern blots. The maximum levels were set as 1, respectively. ○, in leaves; △, in leaf disks.

これは、各セグメントの合成が、経時的にさまざまな調節を受け、さらには分離細胞を用いて同時にウイルスを感染させるいわゆる一段増殖系と異なり、実験系が組織であり、感染時期の異なる細胞が混在している事に原因があると考えられる。

2.5 ウイルス活性とウイルス外被タンパク質の増加

CMV-0 ($100 \mu\text{g/ml}$) 接種葉ならびに切り取って培養したリーフディスクについて、ウイルス活性量ならびにウイルスCP量を経時的に測定した。

ウイルス活性量は、局部病斑宿主のササゲにウイルスを接種し、そこに形成される病斑数をもって算出した。すなわち、感染葉を10倍量 (W/V) のリン酸緩衝液で磨砕した粗汁液と、一定の濃度の精製ウイルス試料を、それぞれ5本のササゲ初生葉の対葉に接種することによ

り相対的なウイルス活性量の平均を測定した。
なお、ウイルス活性すなわち感染性は、ウイルスゲノムにあるので、この場合、粒子に組み込まれていないフリーのウイルスゲノムは細胞内から摩砕によって放出したヌクレアーゼによって分解されると考えられる。従って感染性を持つウイルス粒子の量としてとらえることができる。 Fig. 12はウイルス活性の最大量に対する割合の経時変化を示したグラフである。接種葉試料のウイルス活性は、接種後4-5日にピークを迎え減少後再び増加した。リーフディスク試料中のウイルス活性は、接種後1日目より増加し、3日目に最大に達した後徐々に減少し、再び増加した。最大に達した日数は異なるが、両試料ともウイルス活性量の増加パターンは、RNAの合成の経時変化において接種後4-6日にかけて合成量がピークとなった事に対応すると考えられる。

次にCMVの抗体を用いてエライザ法により各試料についてCP量を測定し、CP合成の経時変

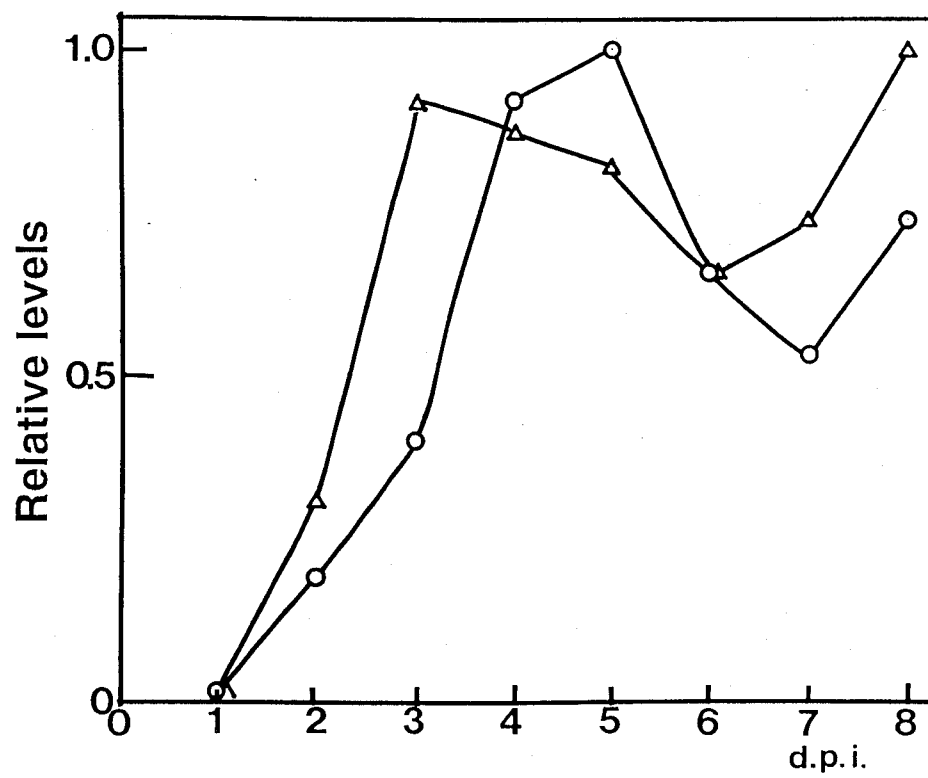


Fig.12 Time course of relative levels of CMV-O infectivity in inoculated leaves and leaf disks. The maximum levels of each infectivity were set as 1, respectively. ○, in leaves; △, in leaf disks.

化について検討した。段階希釈したウイルス精製試料により検量曲線を作成し、これを基に各試料についてCP量を算出後、経時的に最大量に対する割合を求めた。ウイルスCP合成量は、抗原抗体反応によって測定しているもので、感染性や粒子形成に関係なくすべてのCP抗原量としてとらえることができる。接種葉並びに接種リーフディスク両試料ともウイルスCPは接種後2日目より検出され、その後ウイルスRNAやウイルス粒子活性の増加パターンとは異なり、4-6日にも合成を続け7-9日で最大となった(Fig.13)。

2.6 考察

タバコ (*N. tabacum* cv. ky57) に接種されたCMVは、表皮組織から侵入し、葉肉部の柵状組織、海綿状組織、そして周囲の細胞へと移行増殖していく。本法の条件下でのタバコにおけるCMVの細胞間の移行速度は、表皮組織から

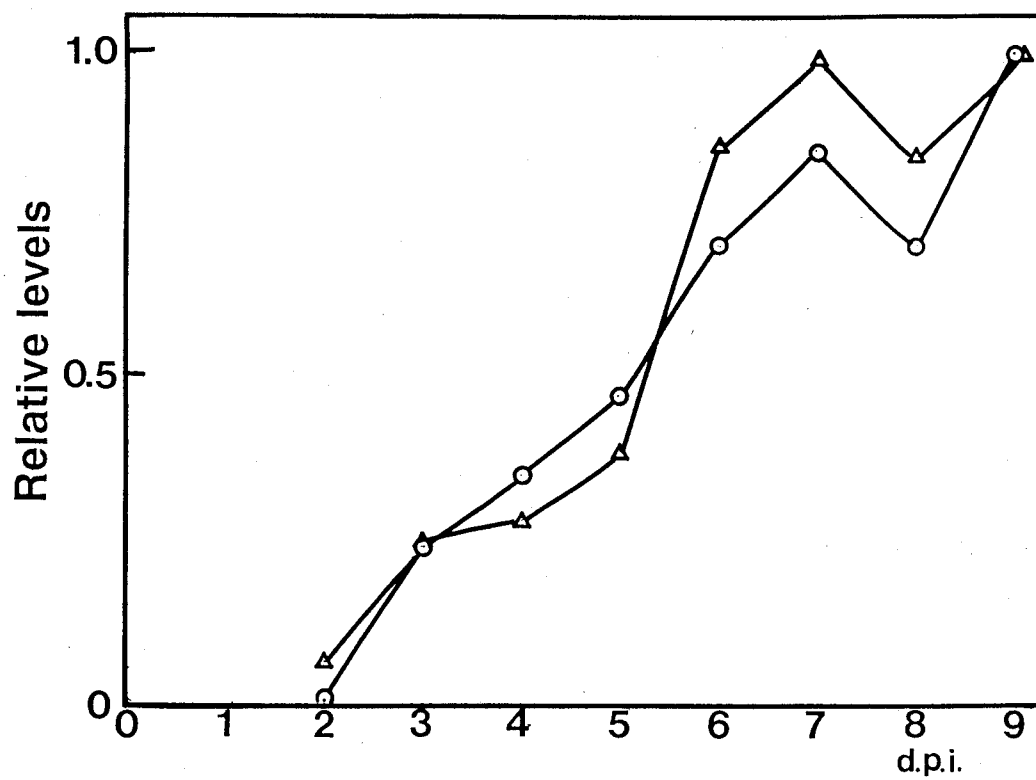


Fig.13 Time course of relative levels of CMV-O coat protein synthesis in inoculated leaves and leaf disks. The maximum levels of each protein were set as 1, respectively. ○, in leaves ; Δ, in leaf disks.

二次感染細胞に7時間、二次組織から裏面表皮までの5層の細胞間は7時間を要する事がすでに示されている(江原, 1966)。従って、組織の中では個々の細胞にウイルスが移行する時間は異なっている。本実験ではまず接種48時間までの感染初期についてウイルスRNA各セグメント合成の経時変化について検討した。すなわち、裏面表皮に接種後、表皮組織を経時的に剥離しウイルスRNA各セグメントの合成量を検討した結果、接種12時間目から合成が認められ、合成量の高い方からRNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4の順であることが示された。また葉肉部においても18時間目より表皮にほぼ対応したパターンで合成した。感染初期のリーフディスクにおいては、RNA 3の合成量がもっとも多く、次いでRNA 2とRNA 1がほぼ同程度で、RNA 4の順に合成量が高かった。各セグメント間の合成量の差については各実験において必ずしも一致しておらず、特にRNA 1とRNA 2の順位がリーフディスクと組織別

の場合とで異なっていたが、RNA 3の合成が優先しRNA 4の合成が遅れる点で同様のパターンで合成されると考えられる。これまで、アクリノマイシンDおよびUV処理によって宿主のDNA由来のRNA合成を阻害したタバコのプロトプラストでは、CMVのRNA 3の合成が優先していることはすでに報告されている(Takanami, *et al.*, 1977)。このことから、感染初期のintactな組織においてもRNA 3の合成が優先する点で同様である事が本実験で明かとなった。

CMV-Y接種リーフディスクにおいても、感染初期のウイルスRNA合成はRNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4の順であり、CMV-O RNA各セグメントの場合と同じような経緯で合成されていくと考えられる。CMV-Oは、タバコ接種葉に対し無病徴、CMV-Yは黄色斑を形成するように、病徴はウイルスの系統によって異なっていた。

Takahashi & Ehara (1993)は、黄色斑発現に関与する遺伝子を解析し、CMV-YのCPとタバコのパーレー種由来のyb1とyb2遺伝子の組み合

わせで黄色斑が形成される事を明らかにしている。CPとybの間に病徴発現前すなわち感染初期にどのような相互作用が起きているのかについては不明であるが、それに伴うウイルスの経時的な増殖量に差はなく(Takahashi and Ehara, 1988)、本実験からウイルスゲノムの発現パターンにおいても違いは認められないと考えられる。

ウイルス活性ならびにウイルスCPは、接種後1-2日目より検出された。本実験ではそれ以降について、接種葉と接種リーフディスク組織におけるウイルス増殖過程をウイルス全RNA合成、ウイルス活性、およびウイルスCP合成の経時変化を測定することにより比較検討した。その結果、ウイルス活性量とウイルス全RNA量に関しては両試料においても、一度ピークに達した後再び増加するパターンを描いた。最初の増加期について接種後6日までのウイルス活性、CP、およびRNAの相対的な増加パターンをグラフにまとめると、CP合成に比べ

ウイルス粒子の増殖やウイルス全RNA合成が先行し、増加の経緯がそれぞれで異なっていた (Fig. 14)。ウイルスの粒子形成がほぼ完了した4-6日後もCPは合成されることやウイルスRNA量は第2の増加期で最初の増加期に比べ多くなっていることから、感染組織の中でウイルスは粒子の他にフリーのRNAやCPなどさまざまな状態で多く存在していると考えられる。

Ehara (1966)は、ウイルス活性量の経時変化に関する研究からリーフディスクに接種した場合、維管束を移行するウイルスを阻止する事で第2の増殖期は生じず、増殖量は一頭曲線になると報告している。本実験の結果、葉組織と、リーフディスクの間にはいずれにおいても二度目の増加が認められた。これは、維管束を移行するウイルスによるものではなく、リーフディスク内の組織において起きている段階的な増殖であり、ウイルスがさまざまな形で存在していることも1つの要因でないかと考えられる。

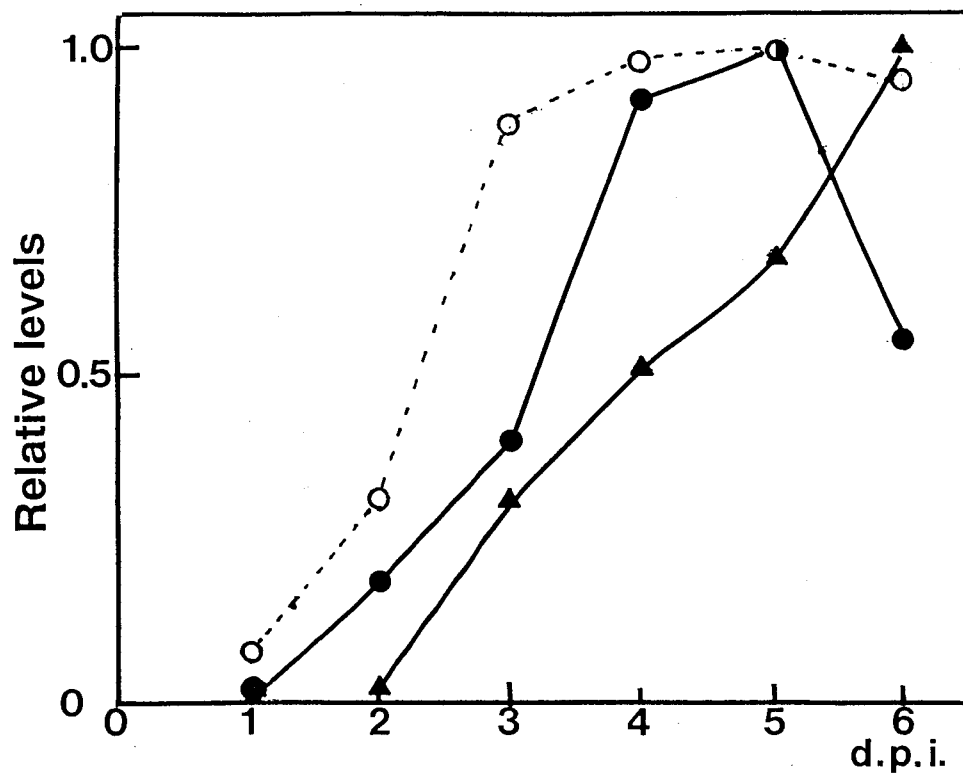


Fig.14 Comparison of the time course of total CMV-O RNA, virus infectivity and coat protein in inoculated leaves. The maximum levels among the 6 days post inoculation in Fig.12,13,14. were set as 1, respectively. ○, total CMV RNA ; ●, virus infectivity; ▲, coat protein.

3 . C M V 接 種 サ サ ゲ 葉 組 織 に お け る ウ イ ル ス 増 殖 の 解 析

ウ イ ル ス は 植 物 に 対 し、 全 身 感 染 す る 場 合
と 局 部 感 染 す る 場 合 が あ る が、 そ れ は ウ イ ル
ス と 宿 主 の 組 み 合 わ せ に よ っ て 決 定 さ れ る。
タ バ コ の 全 身 感 染 に お け る C M V - O お よ び C M V - Y
の 接 種 葉 に お け る ウ イ ル ス の 増 殖 性 に つ い て
は 前 章 で 述 べ た。 一 方、 サ サ ゲ に 対 し て は、
C M V の サ ブ グ ル ー プ I に 属 す C M V - L は 全 身 感 染
し、 C M V - Y , - O の 両 系 統 は 過 敏 感 反 応 を 伴 う 局
部 感 染 を す る。 本 章 で は サ サ ゲ に お い て 感 染
タ イ プ の 異 な る C M V - L と C M V - Y 接 種 葉 に つ い て
病 徴 お よ び ウ イ ル ス 増 殖 過 程 を 解 析 し、 そ れ
ぞ れ の 比 較 検 討 を 行 っ た。

3 . 1 C M V - L 接 種 サ サ ゲ の 場 合

3 . 1 . 1 病 徴

CMV-Lを、完全に展開したササゲ初生葉に摩擦接種し、その病徴を観察した。Fig. 15は、接種後5日目のササゲ初生葉を示している。CMV-Lを接種すると、接種後4日目より径1mm程度の黄色斑が現れ、次第にそれが拡大した。7日を経過すると接種葉全体が黄化し、落葉するものも認められた。また上位葉にはモザイクが形成される。

3.1.2 接種葉組織でのウイルスゲノム合成

CMV-L ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$) をササゲに接種しウイルスRNA各セグメントの合成量の経時変動について検討した。すなわち、接種後経時的にサンプリングした試料から全RNAを抽出し、 $2 \mu\text{g}$ ずつ電気泳動後ノザンハイブリダイゼーションを行った (Fig. 16A)。図では見にくいだが、接種後12時間目からRNA各セグメントのバンドが検出され、以降バンドが濃くなり、RNA 3が他に比べて濃いように思われた。Fig. 16Aを含め3

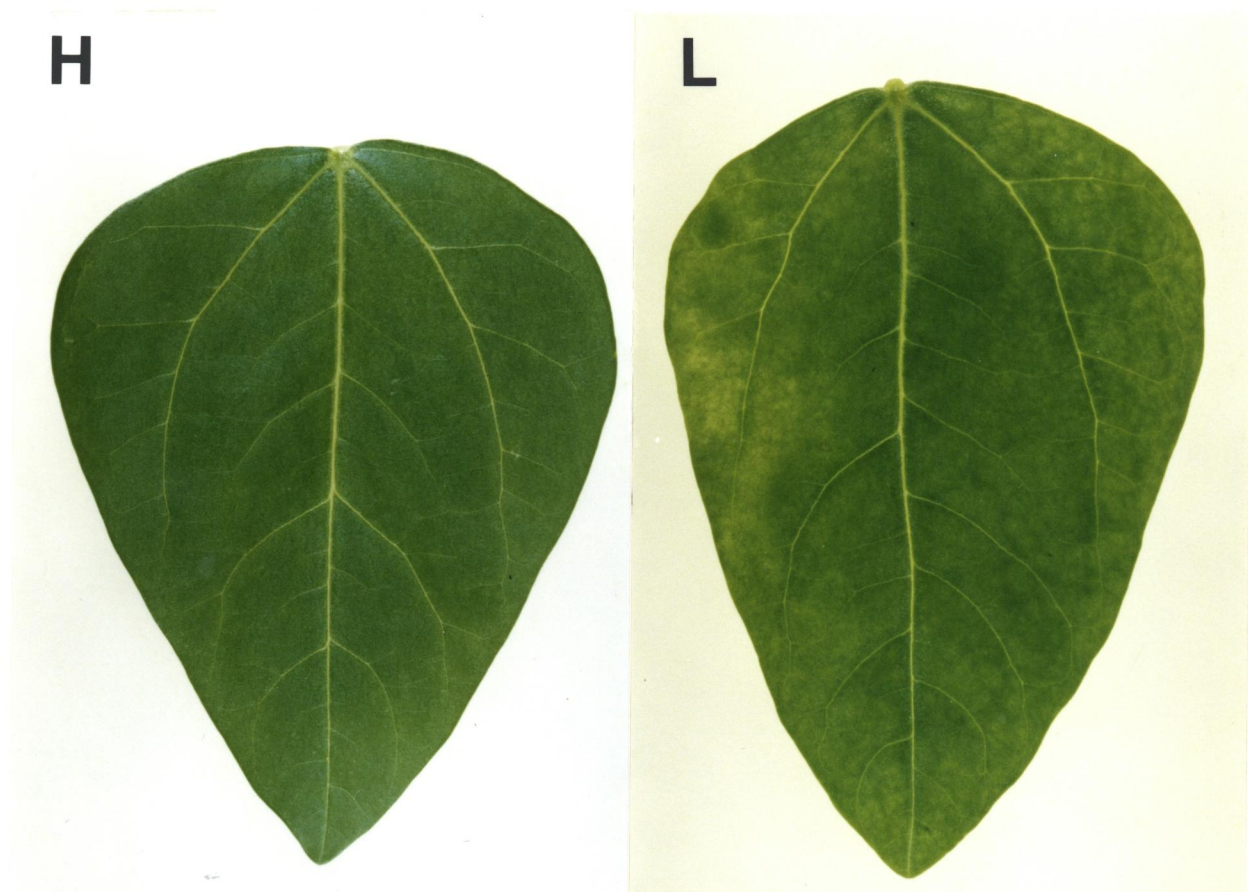


Fig.15 Symptoms produced in CMV-inoculated cowpea(*Vigna unguiculata* cv. kurodane-sanjaku) primary leaf. H, healthy leaf; L, Inoculated leaf with CMV-L at 5days post inoculation.

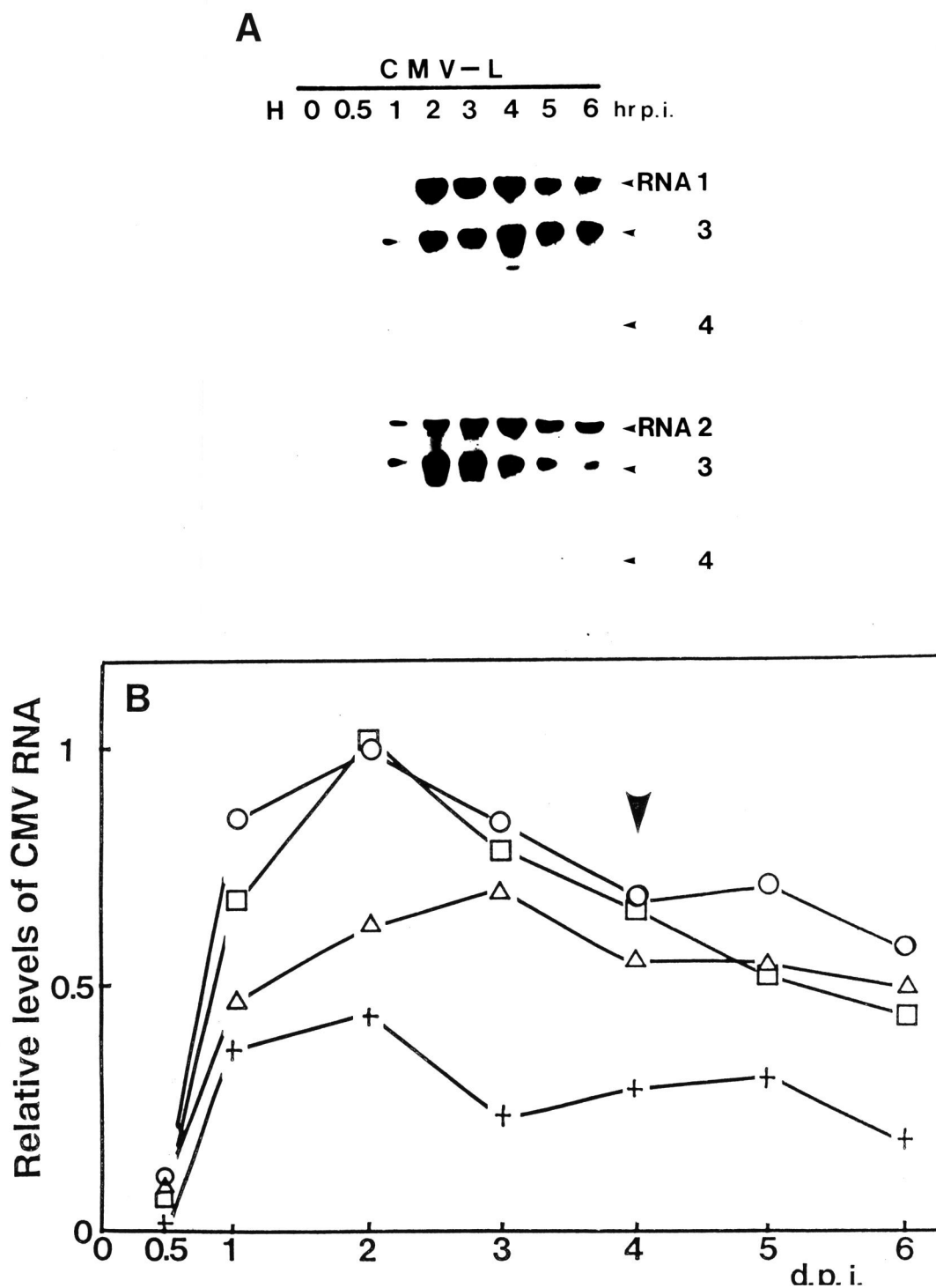


Fig.16 Time course of synthesis of CMV-L RNA segments in inoculated cowpea leaves. (A) Autoradiogram of northern blots with RNA(2 μ g/well) extracted from healthy(H) and inoculated leaves. (B) The relative levels of RNA 1 (□), RNA 2(Δ), RNA 3(○) and RNA 4(+) quantitated from blots. The maximum level of RNA 3 expressed was set as 1. Yellow chlorotic lesion was expressed at 4 days post inoculation(▼).

回の実験より得られたオートラジオグラフィの結果を基にRNA合成量を測定し、接種後2日目のRNA3の合成量を1として相対的なRNA合成量の経時変化をグラフにした(Fig. 16B)。その結果、RNA各セグメントとも接種後12時間目より合成が始まり、接種2-3日で最大に達し、その後病徴が発現した4日目には減少した。

また、増殖期においてRNA各セグメントの合成量を比較すると、接種後2日目ではRNA1がRNA3に比べわずかに多いが、合成量の高い順にRNA3, 1, 2, 4の順であると判定した。

3.1.3 ウイルス全RNAとウイルス外被タンパク質の合成

CMV-L接種葉におけるウイルス全RNA合成量とウイルスCP合成量の経時変化を比較した。すなわち、ウイルス全RNA量はFig. 16より求めた各RNAセグメント合成量を合わせた量を、ウイルスCP量についてはエライザ法によって測

定した量をそれぞれ最大量に対する相対的な量として表した (Fig. 17)。ウイルス全 RNA、ならびに CP 合成は、ともに一頭曲線を描いたが、CP 合成のピークが、ウイルス RNA 合成のそれに比べ、1 日遅れている事が示された。また、外部病徴が現れる時期には、CP 量も減少していた。

3. 1. 4 考 察

本項では、ササゲ接種葉に黄色斑をとともなう全身感染する CMV-L を用いてウイルスゲノムの合成とウイルス CP の合成の経時変化を調べた。

CMV-L をササゲに接種すると、ウイルス RNA 各セグメントは接種 12 時間目より検出され、合成量が高い順に RNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4 であり、接種後 2-3 日で最大になった。CMV 接種タバコ葉での感染初期における RNA 各セグメントの合成パターンと同様の傾向を示

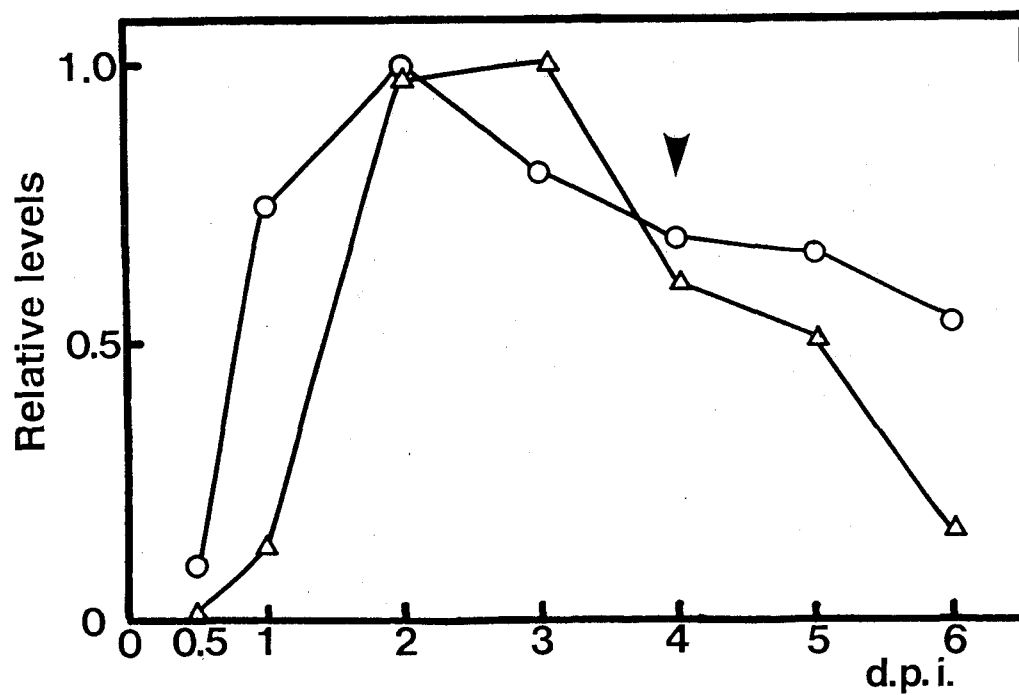


Fig.17 Comparison of the time course of total CMV-L RNA (○) and coat protein (Δ) synthesis in inoculated cowpea leaves. The level of total CMV RNA was determined by summing the amounts of each RNA quantitated from northern blots. The level of coat protein was determined by ELISA. The maximum levels were set as 1, respectively. Yellow chlorotic lesion was expressed at 4 days post inoculation(▼).

した。これは全身感染系でみられる共通の性質であると考えられる。

ウイルス全RNAとCPの合成パターンを比較すると、RNA合成はCP合成に比べ先行する。なお、CPをコードするRNA 4の合成パターンについてもCP合成に先行して合成が進む傾向にある (data not shown)。前章のCMV-0接種タバコ葉組織や、TMV接種タバコプロトプラストにおいてもゲノムRNAに比べCPの合成が遅れる事が示されている (Ogawa & Sakai 1984)。ウイルスゲノムが複製され、続いてCPが合成される様子は、組織レベルにおいても同様であることがわかる。

病徴発現とウイルス増殖の関係については、CMV-L接種ササゲ葉の場合、増殖がピークを過ぎ低下した後の接種4日目に黄色斑が発現した。一方、CMV-Y接種タバコ葉の場合、ウイルスの増殖期に、黄色斑が発現している事が示されており (Takahashi & Ehara, 1988)、ウイルス増殖と黄色斑の発現時期の関係は、ウ

ウイルスと宿主の組み合わせによって異なると考えられる。

宿主の生理変動については、これまでCMVと同じククモウイルス群に属すPSVを用いて解析され、ウイルスの増殖に伴い、Poly(A) mRNA合成の低下やクロマチンにおける非ヒストンタンパクの変動が確認されている(中村, 1987)。これらの研究は、CMV-O, -Yによるササゲの過敏反応に関する研究と比較検討することによってそれぞれの機構を解明するための重要な基礎資料となっているが、CMV-L接種ササゲ葉における生理変動についてはほとんど研究されておらず、今後の解析が待たれる。

3.2 CMV-Y接種ササゲの場合

3.2.1 病徴およびウイルス外被タンパク質の合成

CMV-Yを完全に展開したササゲ初生葉に摩擦接種した場合、発現する病徴をFig. 18に示した。CMV-Yを接種すると、接種12時間後に表面にくぼみが観察され、その後その中心部から褐変し始め、24時間後には全域が褐変化して径0.5mm程度の壊死斑が形成された。従って、肉眼の観察による外部病徴の発現は接種後12時間目である。病徴は接種葉のみ形成され上位葉には現われなかった。

CMV-Y (500 μ g/ml)をササゲの初生葉に接種し、ウイルスCPの増加量を経時的にエライザ法によって測定した。しかし、すでにFig. 17に示したようにCMV-L接種葉では、接種24時間後よりウイルスCPが検出され、2-3日でピークを迎えることが観察されたが、CMV-Y接種葉で



Fig.18 Symptoms produced in CMV-inoculated cowpea(*Vigna unguiculata*. cv. kurodane-sanjaku) primary leaf. Y, Inoculated leaf with CMV-Y at 24 hour post inoculation.

は、 ウ イ ル ス CP は 検 出 さ れ ず、 検 出 限 界 以 下
で あ っ た。 CMV-O 接 種 葉 に つ い て も、 CMV-Y 接
種 の 場 合 と 同 様 に ウ イ ル ス CP は 検 出 さ れ な か
っ た。 従 っ て CMV-L 接 種 で は 接 種 葉 で ウ イ ル ス
が 移 行 増 殖 す る の に 対 し、 CMV-O, Y 接 種 で は、
宿 主 の 過 敏 感 反 応 に と も な い、 ウ イ ル ス の 増
殖 は ほ と ん ど 抑 制 さ れ 局 部 感 染 す る こ と が 示
さ れ た。

3.2.2 ウ イ ル ス ゲ ノ ム の 合 成

CMV-Y (500 μ g/ml) を 接 種 し た サ サ ゲ の 初 生
葉 を 経 時 的 に サ ン プ リ ン グ し、 全 RNA を 抽 出 後
ノ ザ ン 分 析 に よ り ウ イ ル ス RNA 各 セ グ メ ン ト 合
成 の 経 時 変 化 に つ い て 検 討 し た。 ウ イ ル ス CP
量 が ほ と ん ど 検 出 さ れ な か っ た こ と か ら、 ゲ
ル の 一 ウ エ ル あ た り に ロ ード で き る 最 大 量 の
各 全 RNA, 20 μ g を 供 試 し た。 Fig. 19A は、 ノ ザ
ン の 結 果 の 一 例 を 示 し て い る。 ウ イ ル ス RNA 各
セ グ メ ン ト の バ ン ド は、 接 種 後 8 時 間 目 よ り

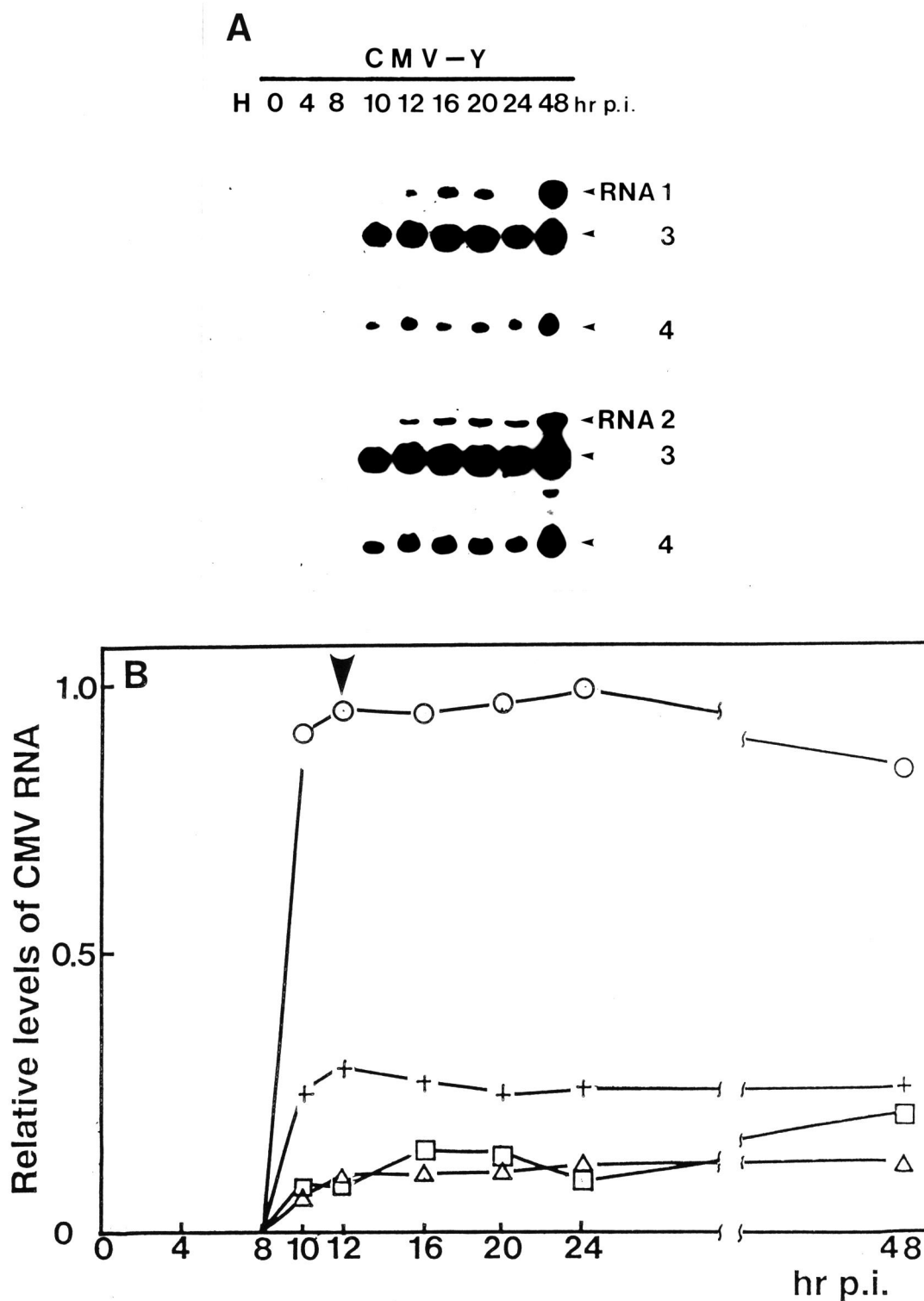


Fig.19 Time course of synthesis of CMV-Y RNA segments in inoculated cowpea leaves. (A) Autoradiogram of northern blots with RNA(20 μ g/well) extracted from healthy(H) and inoculated leaves. (B) The relative levels of RNA 1(□), RNA 2(Δ), RNA 3(○) and RNA 4(+) quantitated from blots. The maximum level of RNA 3 expressed was set as 1. Necrotic local lesion was expressed at 12 hours post inoculation(▼).

検出され、12時間目にはかなり濃く反応し、その後の強さはほぼ一定であった。また、RNA 3のバンドが他のRNAに比べかなり濃く思われた。Fig. 19Aの結果を含め3回の反復実験より得られたバンドの面積をフライングスポットスキナーで測定し、接種24時間目のRNA 3のバンドの面積を1.0として相対的なウイルスRNAの合成量の経時変動をグラフに示した(Fig. 19B)。CMV-Y RNA各セグメントは、接種後8-12時間の間に急激に増加し、その後それぞれの検出量は48時間目までほぼ一定ないしやや減少する傾向を示した。また、その中で、RNA 3の合成量が最も高く、他のセグメントは、RNA 3の合成量の1/3-1/4程度で、RNA 4, RNA 1, RNA 2の順に減少した。この状態は、ウイルスゲノムの合成が止まってからも変化がなかった。

3.2.3 考察

CMV-Yをササゲに接種すると接種後わずか
12時間後に局部壊死斑が観察され、CMV-Lの
場合とはまったく異なる反応が示された。ウ
イルス増殖についても、本法のエライザ法に
よるウイルス外被タンパク質の検出では、
CMV-Lの場合増加が認められているがCMV-Yは
検出することができなかつた。これまで、ウ
イルス活性が感染ササゲ葉抽出液を再度ササ
ゲに接種することで壊死斑形成直後からわず
かに検出されていることから、ウイルス増殖
は極めて抑制されているもののわずかには増
えていると考えられていた(Ehara, 1979)。し
かし、検出限界に近い活性量であることから、
その実態については特に病徴発現前について
不明な点が多い。

本実験では、ノザンハイブリダイゼーショ
ンによってウイルスゲノムの検出を試みた結
果、ウイルスゲノムが合成されているのを経
時的に確認することができた。CMV-RNA各セ
グメントは、接種後8時間目から数時間の間

増加し、接種後12-16時間目頃には合成が停止した。CMV-Lの増殖期が2から3日であるのに比べるとCMV-Yのそれは数時間ときわめて短い間に終了することが示された。

病徴発現にともなうウイルス増殖についてみると、外部病徴が出現した接種後12時間目の直前にウイルスRNA各セグメントの合成が認められ、病徴発現とほぼ同時にウイルスゲノムの合成が停止していると考えられる。一方、CMV-Y、-Oと同じくササゲに局部感染するCMV-Qを使ったウイルス増殖の経時変動についての研究によると、ササゲプロトプラストに接種した場合接種後50時間までウイルスRNAが合成されることが示されている(Gonda & Symons, 1979)。本実験により得られた結果は、プロトプラスト系とは異なり、組織で見られる特徴的な性質であると思われる。

ウイルスRNA各セグメントの合成量を比較すると、RNA 3の合成が他のセグメントに比べて高く、RNA 3 > RNA 4 > RNA 1 > RNA 2の順で

あった。RNA 3が他のセグメントに比べて合成が優位であることは、これまで示してきたタバコ-CMV及びササゲ-CMV-Lの組み合わせによる全身感染系でも同じである。従って、このような性質は宿主の違いに関係なく、ウイルス増殖における基本的な性質であり、RNA 3の情報の中に、これを優先的に合成させるような因子があることを示唆している。RNA 3に対するRNA 1, 2, 4の合成の比率は、 $1/3 - 1/4$ とかなり抑えられており、全身感染系に比べてその差が大きいように考えられる。しかし、これが過敏感反応系における特徴的な性質であるのかについてはさらに解析が必要である。

3.3 全身感染と局部感染におけるウイルス

ゲノム合成の比較

CMV-LとCMV-Y接種ササゲ葉組織におけるウイルス増殖の経時変化の大きな差異は、ともに接種後12時間目にウイルスRNAの合成が認められた後、CMV-Lはその後にも合成が続くのに対し、CMV-YのRNA合成は直ちに停止するという点にみられた。このことより、接種葉組織において、CMVは、系統によって接種後12時間目を境にして合成の様子がまったく異なっていくと考えられる。そこで、それより前の合成について、すなわち接種12時間目までの合成について直接比較検討した。

3.3.1 CMV各系統のウイルス活性検定

各系統それぞれ紫外部吸光度測定による理化学的な手法によって求めた一定の濃度に対するウイルス活性に差がないかどうかについて

て検討した。ウイルスの活性は、通常局部感染宿主に接種しそこで発現した病斑数を測定することによって決定される。各系統の接種源ウイルス精製試料 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ をそれぞれアカザの半葉に接種し葉について病斑数の比をとったところ、CMV-Lに対するCMV-Yの活性比は、平均 1.15 標準誤差 0.12 であり、両系統において大きな差はないと考えられた。

3.3.2 ウィルス全RNAの合成

CMV-Y, L ($500 \mu\text{g}/\text{ml}$) をそれぞれササゲに接種し、接種24時間目まで経時的にサンプリングし、全RNAを抽出後 $20 \mu\text{g}$ を変性後直接ナイロンフィルターにブロットし、ドットブロット分析を行った。プローブは、CMV RNA各セグメントともほとんど共通の配列を持つ3'末端から 172bp のcDNAを調整し、 ^{32}P でラベルしてこれを用いた。従って反応したスポットは、ウイルスRNA各セグメントの合計に等しい。

Fig. 20Aはドットプロットのオートラジオグラフィーを示している。各ウイルスならびに各時間それぞれ4サンプルについてスポットを切り抜きCherenkov測定分析によりRNA量を求め、平均しグラフにした (Fig. 20B)。その結果、CMV-Y接種葉では、Fig. 19の結果と同様にウイルス全RNAは、接種8時間目より12時間目にかけて合成が活発になった。これに対しCMV-L接種葉では、接種4時間目より徐々に増加し、8時間目ではCMV-Yのそれと有意な差が認められ、12時間目では、両ウイルスRNAとも合成量がほぼ等しくなった。しかしそれ以降、すなわち接種後14時間目と24時間目では、CMV-Lは合成を続けたのに対しCMV-Yは、合成が停止した。

3.3.3 考察

感染初期のウイルスゲノムの発現は、その後のさまざまな宿主変動を導く誘導機構を解

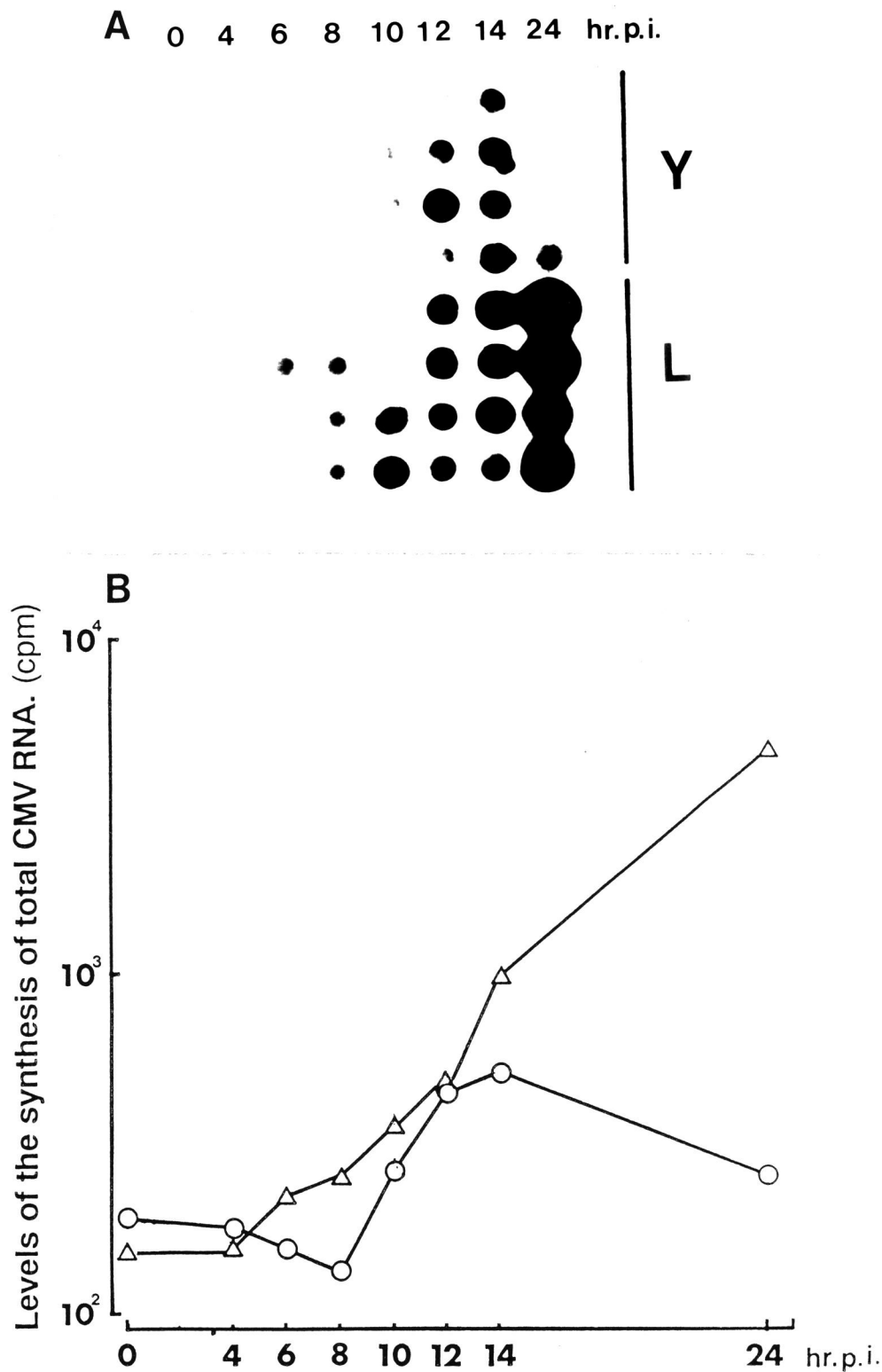


Fig.20 Comparison of the time course of total CMV RNA synthesis. (A) Autoradiogram of a dot blot with RNA(20 μ g/dot) extracted from cowpea leaves inoculated with CMV-L(L) and CMV-Y(Y), respectively. (B) The levels of total CMV RNA quantified by counting the radioactivity of spots of (A) using Cerenkov radiation. O, in CMV-Y-inoculated leaves; Δ , in CMV-L-inoculated leaves.

明する上で重要であり、CMV-LとCMV-Yの増殖過程の差異を直接比較する事によって、それぞれの増殖過程の特異的な点を明確にする事ができる。

ドットプロットハイブリダイゼーションによりウイルスゲノムの合成量を経時的に測定した結果、CMV-LのRNAは接種後4時間目以降から逐次合成が認められた。一方、CMV-Yは8時間目以降から急激に増加した。このことからCMV-Lの合成が接種後早い時期から緩やかな合成をするのに対し、CMV-Yは壊死斑形成の直前に急激な合成をすると考えられる。また、CMV-Yにおいて接種8時間より前にウイルスRNAの合成が検出できないことも、特徴的な性質であると考えられる。

以上のことから、CMV-Y RNA合成の経時変化は、接種後ウイルスの合成が認められない時期、続いて起こる合成が活発になる時期、そして合成が停止する時期の3つの時期(phase)に分けることができると考えられる。ササゲ

における接種後12時間目までの解析は、特にCMV-Yによる壊死斑の外部病徴が接種後12時間頃に見られる事から、過敏反応の誘導機構を探る上で重要である。これまでに報告されている組織内のウイルスの移行、組織の形態的な変動や生理変動に関する研究と経時的に合わせると次のようになった。

最初のphaseでは、ウイルスRNAの合成は検出できない。しかし、接種後表皮剥離や塩酸処理を経時的に行い、後に発現する病斑数から組織内の移行について調べられている。すなわちウイルス粒子とウイルス核酸接種の比較から、CMVは表皮細胞で脱外被に2時間を要し、2時間半で二次感染組織細胞に移行する事が報告されている(Ehara & Misawa, 1967, 1975)。さらに二次感染組織細胞から3次以降の組織細胞へは接種後7時間で移行し、この時期の感染細胞数は、壊死斑形成細胞数の約9割を占めることが推定されている(Ehara & Misawa, 1969)。このようにウイル

スゲノムの移行は認められるが、合成は抑制されると考えられる。

次の phase では、すなわち接種後 8 時間を経過するとこれらの感染細胞に相当する柵状組織細胞に一斉に異常がみられ、萎縮する細胞が観察される。ウイルス RNA の急激な合成もこの時期に一致しており、1, 2, 3 次感染細胞群で一斉に合成が始まり、一斉に萎縮していることを意味するのではないかと考えられた。さらに接種後 11 時間を経過するとウイルス活性がわずかに検出され増加し始め (Ehara, 1979)、12 時間目頃には外部病徴が観察され始める。

最後の phase では、すなわち接種後 14 時間を経過するとウイルス RNA の合成が停止し、ウイルス活性の増加も停止する (Ehara, 1979)。また、新たに萎縮する細胞はなくなり、萎縮した細胞の褐変化が始まる (Misawa & Ehara, 1963)。PRタンパク質はこの頃から増加し始める (Yoshikawa & Ehara, 1993)。そして 16 時

間目になると明瞭な壊死斑が形成されることが形態的に観察される。これらのことから、細胞が萎縮から褐変化に至る数時間の間にしか増殖されないことが示された。

植物ウイルスの感染は、全身感染と局部感染に大別される。典型的な局部感染は過敏反応を伴うもので、感染部位の細胞が急激に壊死し壊死斑が形成される。感染部位が壊死を伴わず退色し黄色斑を形成する場合は、一般にウイルスはその部位にとどまらず全身に移行増殖するので全身感染とみなされる。このような感染のタイプはウイルスと宿主の組み合わせにより決まるものであり、ウイルスの増殖過程に何らかの違いがあることも考えられる。本研究では、感染型の違いを念頭において、感染組織におけるウイルスゲノムの合成過程を解析した。すなわちタバコにおいて全身感染するCMV-O、-Yの増殖性を検討し、さらにササゲにおいて全身感染するCMV-Lと局部感染するCMV-Yの感染におけるウイルスゲノムセグメント合成の特性を比較解析した。このように本研究は、ウイルスゲノムセグメン

トの合成との関連で感染型の特徴を把握しようとした。

以上の研究を始めるに当たり、供試CMV系統のゲノム各セグメントの塩基配列が明らかにされ、同時にそれらの系統間比較がなされなければならない。CMV-0についてはこれまでゲノムRNA 2の塩基配列は不明であったのでその決定をまず行った。塩基配列を比較した結果、CMV-YのRNA 2とは極めて高い98%の相同性が得られた。すでに決定されているRNA 1, 3についても同様にCMV-Yのそれらとの相同性は高い。また、同じくサブグループIのCMV-Fnyとの比較でも同様に高い。一方、サブグループIIのCMV-Qとは相同性は低く、PSV, TAVとはさらに低い。従って、CMV-0とCMV-Yの両系統間についてみれば、生物学的反応性の違いを導くウイルスゲノムの因子が、塩基、ないしORFのアミノ酸配列のわずかな違いに限定されると考えられる。CMV-0に比べCMV-Yがタバコの上位葉に激しいモザイクを誘導することは、ウイ

ルス外被タンパク質 (CP) の 129 番目のアミノ酸によって決定されることが最近明らかになった (鈴木ら, 1992)。さらに接種葉における黄色斑の発現についても CP が関与していることから同じアミノ酸であろうと考えられている (Takahashi & Ehara, 1993)。その他の反応性の違いについては、CMV-0の方がはるかに野外での発生頻度が高いことや百日草に対する病徴の違い等が報告されているが (日高・都丸, 1960; 都丸・日高, 1960)、ゲノムの配列の違いが宿主の反応の違いにどのように関与しているのか今後さらに研究を進めなければならない。

一方、同じくサブグループ I に属す CMV-L についても、最近全ゲノムセグメントの塩基配列が明らかにされ、CMV-0, Y と極めて類似していることがわかってきた (Karasawa, personal communication)。今後、CMV-0, -Y の情報と照らし合わせることによって違いを限定し、特に全身感染と局部感染を決定する因子が推定

できると思われる。

次にタバコあるいはササゲ接種葉における CMV RNA 各セグメント合成の経時変化について、ウイルス RNA の cDNA をプローブとして RNA ハイブリダイゼーション法により検討した。それぞれの感染のタイプの相違は感染の初期のウイルス-宿主相互作用によってすでに決定されると考えられる。接種後 48 時間までについてみると、CMV-0 接種タバコ葉では、RNA 各セグメント合成量は、RNA 3 に続いて RNA 1 か RNA 2 そして RNA 4 の順に多く合成されていることが示された。また、CMV-Y 接種タバコにおいては、合成量は RNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4 の順であった。さらに CMV-L 接種ササゲ系においては、増殖期の期間は、タバコとササゲの場合で異なっているが、RNA 3 > RNA 1 > RNA 2 > RNA 4 の順となった。これらのことから、全身感染の初期における CMV RNA 各セグメントの合成パターンは、組織別やウイルスの系統別に関わらず、RNA 3 の合成が優先し、

RNA 4がもっとも遅れる点で一致していた。また、局 部 感 染 系 の CMV-Y接 種 サ サ ゲ 葉 に お い て も RNA 3の 合 成 が 他 の セ グ メ ン ト に 比 べ 高 く、タ バ コ の プ ロ ト プ ラ ス ト 系 に お い て も RNA 3の 合 成 が 他 に 比 べ て 優 先 し て い る こ と が 示 さ れ て い る (Takanami, et al., 1977)。これら の こ と か ら、CMVに は、RNA 3を 優 先 し て 合 成 す る よ う な ゲ ノ ム の 情 報 が 保 存 さ れ て お り、宿 主 の 応 答 に 関 わ ら ず そ れ が 発 現 す る も の と 考 え ら れ る。

CMV以 外 の 文 節 ゲ ノ ム 型 ウ イ ル ス に 関 す る 報 告 で は、cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)を 同 調 的 に 感 染 さ せ た サ サ ゲ 葉 に お い て、RNA 3, RNA 1, RNA 2の 順 に 合 成 が 始 ま り、RNA 4の 合 成 は も っ と も 遅 れ る が、最 終 的 に は RNA 4の 合 成 量 が も っ と も 多 く な っ た (Dawson, 1978)。AIMV接 種 サ サ ゲ プ ロ ト プ ラ ス ト に お い て は、最 初 に RNA 3 1, 2の 順 に マ イ ナ ス 鎖 が 合 成 さ れ、そ れ か ら RNA 3, 1, 2, 4の 順 に プ ラ ス 鎖 が 複 製 さ れ、最 終 的 に は RNA 4の 合 成 量 が も

っとも多くなることが示されている (Nassuth, et al., 1983)。BMV接種バーレープロトプラストでは、RNA 1とRNA 2に遅れてRNA 3とRNA 4が合成され最終的にはRNA 4の合成がもっとも多くなる (Loesch-Fry & Hall, 1980)。一方、タバコのプロトプラストでは、CCMVやBMVはRNA 3の合成量が他のRNAに比べて優位であることが示されている (Bancroft, et al., 1975)。このようにウイルスRNA各セグメントの合成量やその経時的変化は一定ではないと考えられる。またこれらの合成の経緯の相違は、ウイルス、宿主の組み合わせの違いだけでなく、実験方法や実験系に負う点もあることから、それらの結果がどのような意義を持つのかについてはさらにデータの積み重ねが必要であろう。

局部感染と全身感染について、すなわちササゲの初生葉におけるCMV-YおよびCMV-Lのウイルス増殖には、CMV-Lの全RNAが接種4-6時間目より逐次合成するのに対し、CMV-Y全RNAは

それより遅れて8時間目頃から一時的に急激に合成し、さらにすぐ後の12-14時間目には停止するという相違が認められた。この違いについてCMV-Y感染による壊死斑形成過程と照し合わせると、宿主側の変動として始めて観察される細胞の萎縮の時期にウイルスRNA各セグメントが合成され、細胞の壊死化とほぼ同時に合成が停止している(Misawa & Ehara, 1963)。従ってCMV-Yのゲノム合成は壊死斑形成と密接な関係にあることが考えられる。さらにそれより前の時期については、CMV-Y RNAの合成はCMV-Lとの比較から抑制されていると考えられる。しかしその違いが過敏反応にどのように関与しているのかについては不明である。

以上のように染葉におけるウイルス増殖機構について感染初期のウイルスゲノム合成を中心に解析し、タバコおよびササゲにおいてその反応性の違いに関係なく基本的にCMVゲノム各セグメントの合成の経緯は類似していることが明らかとなった。またササゲについて、

CMV-Lによる全身感染とCMV-Yによる過敏反応による局部感染とでは、前者では逐次ウィルス全RNAが増加するのに比べ後者は増殖開始に遅れを生じるという違いがあることも明らかとなった。これらの増殖パターンがその後の感染にどのように関与していくかを明らかにするためには、ウィルスゲノムの持つORFからのタンパクの発現についての量的、時間的相互関係を明らかにする必要があるだろう。

VI 摘 要

キュウリモザイクウイルス (CMV) 染植物におけるウイルス増殖性を明らかにする事を目的としウイルスゲノムの各セグメントとの葉組織内増殖について解析した。まず供試 CMV 系統のゲノム構造の相違について検討し、ついでタバコ (*N. tabacum* L. cv. ky-57) に対する CMV 普通系統 (CMV-0) および黄斑系統 (CMV-Y) の全身感染、ササゲ (*Vigna unguiculata* cv. Kurodane-sanjyaku) に対する CMV マメ科系統 (CMV-L) の全身感染と CMV-Y の局部感染についてウイルスゲノムセグメント合成の経時変化を調べ、それぞれの感染型におけるウイルスゲノム合成の共通性と相違点を明らかにした。

1. 供試 CMV-0 の未決定であったゲノムセグメントについて、RNA 2 の塩基配列を決定した。これにより本ウイルスの全ゲノムセグメント

の塩基配列が明らかになった。CMV-ORNA 2は、85ntの5' non-coding regionに続いて2,571ntのORFが存在し、393ntの3' non-coding regionが続く全長3,049ntから成っていた。ORFは、分子量96,777、857アミノ酸からなる2aタンパク質をコードしており、RNAポリメラーゼのコンセンサスシーケンスエレメントが保存されていた。

他のククモウイルス群のRNA 2の塩基配列との相同性を比較したところ、PSV, TAVとはそれぞれ59.8%, 59.0%、CMVサブグループIIのCMV-Qとは71.4%であった。これに対し、サブグループIに属すCMV-YやCMV-Fnyとは極めて高い98.0-99.4%の相同性を示し、わずかの違いは5'側から60-65番目に塩基置換や欠損が集中している他は全域に散在した。また、ORFのアミノ酸配列のレベルではさらに相同性が高くなった。CMV-LについてもサブグループIの間の相同性と同じように極めて高いと考えられる。

CMV-ORNA 1, 3の non-coding regionと比較

した結果、5' non-coding regionについてはRNA 1とRNA 2との間に72%の相同性がみられたが、そのほかの組み合わせでは50%以下で相同性は低かった。3' non-coding regionについては、3'末端側は極めて相同性が高く、5'側に進むにつれて塩基の違いが若干認められた。これらの違いは、系統間にみられる生物学的反応性の違いやゲノムセグメント間の合成の特性の違いに関与していると考えられた。

2. タバコの接種葉に無病徴の全身感染するCMV-0の増殖の経時変化について検討した結果、接種後48時間までの感染初期においてウイルスRNA各セグメントは、一次感染組織の表皮組織、および葉肉組織並びにリーフディスクでも、RNA 3合成量がもっとも高く、次いでRNA 1あるいはRNA 2が続きRNA 4の合成量はもっとも低かった。

ウイルス全RNAの合成量およびウイルス活性(粒子)量は接種後4日目頃にピークを迎え

その後再び増加し、組織の中で段階的な増殖が認められた。一方ウイルス外被タンパク質(CP)は7日頃まで増加を続け、増加のパターンが異なっていた。また接種リーフディスクにおいてもそれぞれの増加パターンと同様の傾向を示した。

接種葉タバコに黄色斑を形成するCMV-Yについても、RNA 3の合成量がもっとも高く、ついでRNA 1>RNA 2と続きRNA 4の合成量がもっとも低い結果が得られた。ウイルスの系統の違いによらずタバコの組織においてはほとんど同じパターンでウイルスゲノムが合成されると考えられた。

3. ササゲの接種葉に黄色斑を形成し全身感染するCMV-Lの増殖を解析した結果、ウイルスの各ゲノムセグメントは、接種後12時間目より検出されRNA 3>RNA 1>RNA 2>RNA 4の順に合成量が高く、接種2から3日で最大に達した。ウイルスCP合成のピークは、ウイルス全RNA合

成のピークにやや遅れる傾向が認められた。

ウイルス増殖期の期間はタバコの組織の場合に比べ早くピークに達したが、ゲノムセグメントの合成パターンは類似していた。

4. CMV-Y接種ササゲにおける過敏反応による局部感染でのCMV-Yの増殖過程を解析した。エライザ法によってウイルスCPを測定したが、ほとんど検出されなかった。一方RNA各セグメントは接種後8時間から急激に増加し、外部病徴が現れた12-14時間目には合成が停止した。RNA各セグメントの合成量を比較すると、RNA 3の合成量が他のセグメントに比べかなり多く、RNA 4, RNA 1, RNA 2の順に低下した。RNA 3の合成が優勢であることは、宿主の応答の違いに影響されることなく、ウイルス側が持つ固有の反応であると考えられた。

5. ササゲにおけるCMV-LとCMV-Yの全RNA合成を比べると、CMV-Lの全RNAは接種後4時間目頃

から徐々に増加が認められ、CMV-YはCMV-Lに比べ遅れて合成が始まり比較的短時間の間に急激に合成された。このことからウイルスゲノムの合成の経緯が感染の初期から異なると考えられた。

以上のことから、本実験に供試したCMV-O, -Y, -Lの3系統はゲノム構造が極めて類似しているが、宿主組織別ならびにその反応性の違いによってゲノムRNA各セグメントの合成期の期間は大きく異なっていることが明らかになった。また各セグメント別の合成パターンは、感染初期において移行タンパク質とCPをコードするRNA 3の合成量がもっとも高い点で基本的に類似していることが明らかになった。

VII 引 用 文 献

Bernal, J.J., Moriones, E. and Garcia-Arenal, F. (1991). Evolutionary relationships in cucumoviruses: nucleotide sequence of tomato aspermy virus RNA 1. J. gen. Virol. 72:2191-2195.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1522.

Bancroft, J.B., Motoyoshi, F., Watts, J.W. and Dawson, J.R.O. (1975). Cowpea chlorotic mottle and brome mosaic viruses in tobacco protoplasts, in Modification of the Information Content of Plant Cells, Markham R., Davis, D.R., Hopwood, D.A. and Horne, R.W., Eds., North-Holland, Amsterdam, 1975, 133.

Chomczynski, P and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.

Davies, C. and Symons, R.H. (1988). Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. Virology 165: 216-224.

Dawson, W.O., Schlegel, D.E. and Lung, M.C.Y. (1975). Synthesis of tobacco mosaic virus in intact tobacco leaves systemically inoculated by differential temperature treatment. Virology 65:565-573.

Dawson, W.O. (1978). Time-course of cowpea chlorotic mottle virus RNA replication. Intervirology 9:119-128.

Dawson, W.O. and Schlegel, D.E. (1976). Time-course of tobacco mosaic virus-induced RNA synthesis in synchronously infected tobacco leaves. Phytopathology 66: 437-442.

DeBorde, D.C., Naeve, C.W., Herlocher, M.L. and Maassab, H.F. (1986). Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferase. Anal. Biochem. 157:275-282.

Deom, C.M., Oliver, M.J. and Beachy, R.N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. Science 237:389-394.

Doolittle, S.P. (1916). A new infectious mosaic disease of cucumber. Phytopathology 6:145-147.

Edwards, M.C. and Gonsalves, D. (1983). Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. Phytopathology 73: 1117-1120.

Ehara, Y (1979) Multiplication of cucumber mosaic virus in cowpea leaves. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45: 738-740.

Ehara, Y and Misawa, T. (1967) Studies on the infection of cucumber mosaic virus. III. Time of the infection after inoculation with whole virus or with viral nucleic acid. Tohoku J. Agri. Res., 17: 193-200.

Ehara, Y and Misawa, T. (1968) Studies on the infection of cucumber mosaic virus. V. The observation of epidermal cell in the local lesion. Tohoku J. Agri. Res., 19: 166-172.

Ehara, Y and Misawa, T. (1969) Studies on the infection of cucumber mosaic virus. VI. Process of formation of local lesion. Tohoku J. Agri. Res., 20: 107-118.

Ehara, Y and Misawa, T. (1974) Studies on the infection of cucumber mosaic virus. IX. Crystalline virus aggregates in infected cells. Tohoku J. Agri. Res. 25: 43-57.

Ehara, Y and Misawa, T. (1975) Studies on the infection of cucumber mosaic virus. VIII. Effect of temperature on the virus spreading and the size of local lesion. Ann. Phytopath. Soc. Japan 41: 15-23.

Fry, P.R. and Matthews, R.E.F. (1963). Timing of some early events following inoculation with tobacco mosaic virus. Virology 19:461-469.

Gething, M.J., Bye, J., Skehel, J. and Waterfield, M. (1980) Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus. Nature 287:301-306.

Gonda, T.J. and Symons, R.H. (1979). Cucumber mosaic virus replication in cowpea protoplasts: Time course of virus, coat protein and RNA synthesis. J. gen. Virol. 45: 723-736.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, reconvination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4713-4730.

Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.

Habili, N. and Symons, R.H. (1989) Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Res.* 17:9543-9555.

Hanada, K. and Tochiwara, H. (1980). Genetic analysis of cucumber mosaic, peanut stunt and chrysanthemum mild mottle viruses. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46:159-168.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.

Hayakawa, T., Mizukami, M., Nakajima, M. and Suzuki, M. (1989). Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain O: Comparative study of nucleotide sequences and amino acid sequences among CMV strains O, Q, D and Y. *J. gen. Virol.* 70: 499-504.

Hayakawa, T., Mizukami, M., Nakajima, I. and Suzuki, M. (1990). Cloning and sequencing of RNA-1 cDNA from cucumber mosaic virus strain O. *Gene* 89: 296.

Hayes, R.J. and Buck, K.W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA dependent RNA polymelase. Cell 63: 363-368.

Holmes, F.O. (1938) Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. Phytopathology 28:553-561.

Iwanoski, D. (1892). Ueber die mosaikkrankheit der tabakspflanze. Bull. Acad. Imp.Sci. St.-Petersbourg, (New Ser.) 3:65-70.

Jagger, I.C. (1916). Experiment with the cucumber mosaic disease. Phytopathology 6:148-151.

Joshi, S., Pleij, C.W.J., Haenni, A.-L., Chapeville, F. and Bosch, L. (1983). properties of the tobacco mosaic virus intermediate length RNA-2 and its translocation. Virology 127:100-111.

Kamer, G. and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent RNA polymerase from plant, animal and bacterial viruses. Nucleic Acids Res. 12: 7269-7282.

Kaper, J.M., and Waterworth, H., E.: Cucumoviruses. In "Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis" (E. Kurstak, Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1981, pp.257-332.

Karasawa, A., Nakaho, K., Kakutani, T., Minobe, Y. and Ehara, Y. (1991). Nucleotide sequence of RNA 3 of peanut stunt cucumovirus. Virology 185: 464-467.

Karasawa, A., Nakaho, K., Kakutani, T. Minobe, Y. and Ehara, Y. (1992). Nucleotide sequence analyses of peanut stunt cucumovirus RNAs 1 and 2. J. gen. Virol. 73: 701-707.

Kataoka, J., Masuta, C. and Takanami, Y. (1990a). Complete nucleotide sequence of RNA 2 of cucumber mosaic virus Y strain. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 495-500.

Kataoka, J., Masuta, C. & Takanami, Y. (1990b). Complete nucleotide sequence of RNA 1 of cucumber mosaic virus Y strain and evolutionary relationships among genome RNAs of the virus strains. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 501-507.

Koenig, R. and Paul, H.L. (1982). Variants of ELISA in plant virus diagnosis. J. Biological Methods. 5:113-125.

Lehto, K., Bubrick, P. and Dawson, W.O. (1990). Time course of TMV 30K protein accumulation in intact leaves. Virology 174:290-293.

Loesch-Fries, L.S. and Hall, T.C. (1980). Synthesis, accumulation and encapsidation of individual brome mosaic virus RNA components in barley protoplasts. J. gen. Virol. 47:323-332.

Lot, H., Marrou, J., Quiot, J.B. and Esvan, C. (1972). Contribution a l'etude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). ANN. Phytopathol. 4:25-38.

Malamy, J., Carr, J.P., Klessing, D.F. and Raskin, I. (1991). Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science 250:1002-1004.

Misawa, T. and Ehara, Y. (1963) Studies on the infection of cucumber mosaic virus. I. Degrees of the injury of cells and the infection. Tohoku J. Agri. Res., 14: 143-162.

Morch, M.D., Boyer, J.C. and Haenni, A.L. (1988). Overlapping open reading frames revealed by complete nucleotide sequencing of turnip yellow mosaic virus genomic RNA. Nucleic Acids Res. 16: 6157-6172.

Moriones, E., Roossinck, M.J. and Garcia-Arenal, F. (1991). Nucleotide sequence of tomato aspermy virus RNA 2. J. gen. Virol. 72: 779-783.

Mossop, D.W. and Francki, R.I.B. (1977). Association of with aphid transmission of cucumber mosaic virus. Virology 81:177-181.

Nassuth, A., Gerdy Ten Bruggencate and Bol, J.F. (1983) Time course of alfalfa mosaic virus RNA and coat protein synthesis in cowpea protoplasts. Virology 125: 75-84.

Nishiguchi, M., Motoyashi, F. and Oshima, N. (1978). Behaviour of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. J. gen. Virol. 39:53-61.

Nitta, N., Masuta, C., Kuwata, S. & Takanami, Y. (1988a). Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 3 between Y strain and Q strain. Ann. Phytopath. Soc. Japan 54: 516-522.

Nitta, N., Takanami, Y., Kuwata, S. & Kubo, S. (1988b). Inoculation with RNAs 1 and 2 of cucumber mosaic virus induces viral RNA replicase activity in tobacco mesophyll protoplasts. J. gen. Virol. 69: 2695-2700.

Ogawa, M. and Sakai, F. (1984). Messenger RNA for tobacco mosaic virus coat protein in infected tobacco mesophyll protoplasts. Phytopath. Z. 109:193-203.

Ohashi, Y., Shimomura, T. and Matsuoka, M. (1986). Acquisition of resistance to TMV Coincident with induction of pathogenesis-related proteins by TMV infection chemical treatment in tobacco leaves. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52:626-635.

Ohki, S., Takami, Y. and Inouye, T. (1990). Accumulation of double-stranded RNAs 3 and 4 in the symptomless leaves and green areas of mosaic-affected leaves of tobacco plants infected with cucumber mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56:213-218.

Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., Nishiguchi, M. and Kiho, Y. (1983). Single amino acid substitution in 30K protein of TMV defective in virus transport function. Virology 131:255-258.

O'Reilly, D., Thomas, C.J.R. and Coutts, R.H.A. (1991). Tomato aspermy virus has an evolutionary relationship with other tripartite RNA plant viruses. J. gen. Virol. 72:1-7.

Otsuki, Y., Shimomura, T. and Takebe, I. (1972). Tobacco mosaic virus multiplication and expression of the N gene in necrotic responding tobacco varieties. Virology 50:45-50.

Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Tahar, S.B. and Palukaitis, P. (1990). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3. J. gen. Virol. 71: 2243-2249.

Palukaitis, P., Garcia-Arenal, F., Sulzinski, M.A. and Zaitlin, M. (1983). Replication of tobacco mosaic virus. VII. Further characterization of single- and double-stranded virus-related RNAs from TMV-infected plants. Virology 131:533-545.

Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G. and Francki, R.I.B. Cucumber mosaic virus. (1992) Advances in Virus Res. 41: 281-348.

Peden, K.W.C. and Symons, R.H. (1973). Cucumber mosaic virus contains functionally divided genome. Virology 53: 487-492.

Pouge, G.P., Marsh, L.E. and Hall, T.C. (1990). Point mutations in the ICR2 motif of brome mosaic virus RNAs debilitate (+) strand replication. Virology 178:152-160.

Rao, A.L.N. and Francki, R.I.B. (1982). Distribution of determinants for symptom production and host range on the three RNA components of cucumber mosaic virus. J. gen Virol. 61: 197-205.

Rao, A.L.N. Dreher, T.W., Marsh, L.E. and Hall, T.C. (1989). Telomeric function of the t-RNA-like structure of brome mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5335-5339.

Rezaian, M.A., Williams, R.H.V., Gordon, K.H.J., Gould, A.R. and Symons, R.H. (1984). Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 2 reveals a translation product significantly homologous to corresponding proteins of other viruses. *Eur. J. Biochem.* 143: 277-284.

Rezaian, M.A., Williams, R.H.V. and Symons, R.H. (1985). Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 1. Presence of a sequence complementary to part of the viral satellite RNA and homologies with other viral RNAs. *Eur. J. Biochem.* 150: 331-339.

Rizzo, T.M. and Palukaitis, P. (1988). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 2. *J. gen. Virol.* 69: 1777-1787.

Rizzo, T.M. and Palukaitis, P. (1989). Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. *J. gen. Virol.* 70: 1-11.

Saito, T., Meshi, T., Takamatsu, N. and Okada, Y. (1987). Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6074-6077.

Sakai, F. and Takebe, I. (1970). RNA and protein synthesis in protoplasts isolated from tobacco leaves. *Biochem. Biophys. Acta* 224:531-540.

Sakai, F. and Takebe, I. (1974). Protein synthesis in tobacco mesophyll protoplasts induced by tobacco mosaic virus infection. *Virology* 62:426-433.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463-5467.

Schwinghamer, M.W. and Symons, R.H. (1977). Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell-free systems and in toad oocytes. Virology 79: 88-108.

Shintaku, M.H. (1991). Coat protein gene sequence of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlaing with chlorosis induction. J. gen. Virol. 72:2587-2589.

Shintaku, M.H., Zhang, L. and Palukaitis, P. (1992). A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. Plant Cell 4:751-757.

Stanley, W.M. (1935). Isolation of a crystalline protein proccessing the properties of tobacco mosaic virus. Science 81:644-645.

Sulzinski, M.A., Gabard, K.A., Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1985). Replication of tobacco mosaic virus. VIII. Characterization of a third subgenomic TMV RNA. Virology 145:132-140.

Takahashi, H. and Ehara, Y. (1988). Comparison of protein and mRNA syntheses in tobacco leaves infected with the yellow or the ordinary strain of cucumber mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 54:164-173.

Takahashi, H. and Ehara, Y. (1992). Changes in the activity and polypeptide composition of the oxygen-evolving complex in photosystem II of tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Molecular plant Microbe interactions* 5:269-272.

Takahashi, H. and Ehara, Y. (1993). Severe chlorotic spot symptoms in cucumber mosaic virus strain Y-infected tobaccos are induced by a combination of the virus coat protein gene and two host recessive genes. *Molecular plant Microbe interactions* 6:182-189.

Takahashi, H., Ehara, Y. and Hirano, H. (1991). A protein in the oxygen-evolving complex in the chloroplast is associated with symptom expression on tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus strain Y. *Plant Molecular Biology* 16:689-698.

Takanami, Y. and Tomaru, K. (1969). Effect of EDTA on cucumber mosaic virus and its application in purification. *Virology* 37:293-295.

Takanami, Y., Kubo, S. and Imaizumi, S. (1977) Synthesis of single- and double-stranded cucumber mosaic virus RNAs in Tobacco Mesophyll protoplasts. *Virology* 80: 376-389.

Valleau, W.D. and Johnson, E.M. (1943). An outbreak of plantago virus in burley tobacco. *Phytopathology*. 33:210-219.

Van Loon, L.C. and Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun NN". II. Changes in protein constitution

after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40:199-211.

Watanabe,Y. and Okada,Y. (1986). *In vitro* viral RNA synthesis by a subcellular fraction of TMV-inoculated tobacco protoplasts. Virology 149:64-73.

Watanabe,Y., Emori,Y., Ooshika,I., Meshi,T., Ohno,T. and Okada,Y. (1984). Synthesis of TMV specific RNAs and Proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: Transient expression of the 30K protein and its mRNA. Virology 133:18-24.

Yalpani,N., Silverman,T., Wilson,M.A., Kleier,D.A. and Raskin,I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. Plant Cell 3:809-818.

Yoshikawa, M., Nakamura, S. and Ehara,Y. (1993). General properties of pathogenesis-related proteins produced in cowpea leaves infected with cucumber mosaic virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 59:196-199.

Zelcer,A., Weaber,K.F., Balazs,E. and Zaitlin, M. (1981). The detection and characterization of viral-related double-stranded RNAs in tobacco mosaic virus-infected plants. Virology 113:417-427.

江 原 淑 夫 (1 9 6 6) 東 北 大 学 大 学 院 博 士 論 文

日 高 醇 ・ 都 丸 敬 一 (1 9 6 0) タ バ コ か ら え ら れ
た キ ウ リ モ ザ イ ク ウ イ ル ス の 系 統 第 I 報
普 通 系。 秦 野 た ば こ 試 験 場 報 告 4 6 : 1 2 5 - 1
3 4

中 村 茂 雄 (1 9 8 7) 東 北 大 学 大 学 院 修 士 論 文

本 吉 総 男 (1 9 8 8) 植 物 ウ イ ル ス 抵 抗 性 発 現 に
お け る 遺 伝 子 間 相 互 作 用 一 タ バ コ モ ザ イ ク
ウ イ ル ス に 対 す る 抵 抗 性 を 中 心 と し て 一 細
胞 工 学 7 : 2 2 0 - 2 2 9 .

鈴 木 匡 ・ 桑 田 茂 ・ 高 浪 洋 一 (1 9 9 2) キ ュ ウ リ モ
ザ イ ク ウ イ ル ス 黄 斑 系 と 普 通 系 に お け る 病 徴
発 現 の 差 異 に 関 与 す る 領 域 の 解 析 5 8 : 6 2 7

都 丸 敬 一 ・ 日 高 醇 (1 9 6 0) タ バ コ か ら え ら
れ た キ ウ リ モ ザ イ ク ウ イ ル ス の 系 統 第 I I
報 黄 斑 系。 秦 野 た ば こ 試 験 場 報 告 4 6 : 1
4 3 - 1 4 9